



**Tatiana Irina Pereira Frechaut**

Licenciatura Análises Clínicas e de Saúde Pública

**Validação de metodologia para deteção  
de *Bacillus cereus* em arroz e produtos  
à base de cereais**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança  
Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Ana Lúcia Leitão, FCT-UNL  
Co-orientadora: Engenheira Ana Machado, SGS

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões

Vogais: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte  
Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Julho de 2014**





**Tatiana Irina Pereira Frechaut**

Licenciatura Análises Clínicas e de Saúde Pública

**Validação de metodologia para deteção  
de *Bacillus cereus* em arroz e produtos  
à base de cereais**

“Validação de metodologia para deteção de *Bacillus cereus* em arroz e produtos à base de cereais.” COPYRIGHT© de Tatiana Irina Pereira Frechaut, FCT-UNL, UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## AGRADECIMENTOS:

A Tese de Mestrado ora apresentada, representa um marco importante da minha vida. Este emocionante ciclo que agora termina, proporcionou-me formação, conhecimento, amizade, solidariedade e, acima de tudo, crescimento individual.

Este meu percurso não se mostrou solitário, na medida em que foram vários os que me acompanharam, incentivaram e guiaram.

Em consequência, e porque nada conseguiria sem eles, gostaria de prestar os meus sentidos agradecimentos:

À Professora Ana Lúcia, pela dedicação, preocupação e apoio com que me presenteou durante todo o período de realização desta tese;

À Engenheira Ana Machado, por toda a amabilidade e disponibilidade com que sempre pautou a sua conduta, dissipando dúvidas e cimentando certezas;

A todo o grupo com quem eu tive o privilégio de trabalhar na concretização da minha tese, em particular toda a equipa de laboratório de microbiologia da Sociedade Geral de Superintendência – SGS, S.A. efetivamente, a experiência adquirida e pela equipa transmitida, foi fundamental e preciosa para o meu trabalho;

Ao imprescindível na minha vida, ao amor de meus Pais. Sem eles, a dissertação ora concluída jamais teria sido possível. Obrigada pelo apoio incondicional, pelo esforço e pelo amparo, sempre tão reconfortante.

Ao Diogo Neves, sempre companheiro, sempre presente nesta tão marcante etapa das nossas vidas.

A todos os meus amigos, com especial agradecimento a Andreia Paulos, Liliana Matos e Ana Carvalho, pelo forte apoio e ajuda que manifestaram durante todo o período de estágio;

Por fim, a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que eu alcançasse esta tão importante e desejada meta na minha vida.

Obrigada e um bem-haja para todos.



## RESUMO:

Atualmente o grande desafio do sector alimentar é o de restabelecer a confiança dos consumidores, dando-lhes a conhecer todas as medidas de prevenção e controlo utilizadas nas atividades de manuseamento alimentar. Embora genericamente conhecidas como toxinfecções alimentares, as doenças transmitidas por alimentos são classificadas como uma doença que resulta da ingestão de alimentos contaminados com agentes etiológicos prejudiciais.

O *Bacillus cereus* é um bacilo Gram-positivo, produtor de esporos que tem como reservatório natural o solo. Este microrganismo é reconhecido como um agente etiológico de doenças de origem alimentar há mais de 40 anos. Os surtos associados ao *Bacillus cereus* estão relacionados com várias matrizes alimentares tais como arroz e massas. A presença de grande quantidade de microrganismos ( $\geq 10^6$ ) no alimento é indicativo de crescimento e proliferação do organismo constituindo deste modo, um potencial perigo para a saúde.

O arroz é um cereal que faz parte da dieta habitual dos habitantes de todo o mundo e é também o alimento que tem estado mais envolvido em toxinfecções alimentares associadas ao *Bacillus cereus*.

O objetivo principal deste trabalho de investigação, realizado na empresa SGS, é a implementação de uma metodologia que permite a pesquisa e enumeração de *Bacillus cereus* no arroz e produtos à base de cereais. Esta metodologia tem por base um procedimento específico (EN ISO 7932:2005), dando resultados com maior rapidez que o método tradicional (ISO 7932:2004) e foi desenvolvido pela empresa Bio-Rad®.

Os resultados dos testes realizados a 15 amostras alimentares, dos quais as contagens de colónias em placa de MYP® e BCM®, visualização da produção de  $\beta$ -Hemolisina em agar sangue -5%- (Bio-rad®) e resultados do perfil bioquímico identificados em galerias API 50 CH® e API 20 E® (BioMérieux®), foram concordantes em ambos os métodos o que permite que o novo método implementado seja validado.

**Palavras-chave:** Toxinfecções alimentares; *Bacillus cereus*; Arroz; Implementação de método; EN ISO 7932:2005.





## ABSTRACT:

At the present time, the greatest challenge of food sector's is to restore consumers trust and raise awareness for all the used measures to prevent and control food handling activities. Although generally known as food intoxications, the foodborne diseases are classified as diseases that results from ingestion of food contaminated with harmful etiologic agents.

*Bacillus cereus* is a Gram-positive *bacillum* and spore producer, being soil its natural reservoir. This organism is recognized as a causative agent of food-borne diseases for over 40 years. Outbreaks associated with *Bacillus cereus* are related to various food matrices such as rice and pasta. The presence of large numbers of microorganisms in food ( $\geq 10^6$ ) is an indication of growth and proliferation of the organism, consistent with a potential health hazard.

Rice is equally part of the usual diet of the inhabitants of the whole world and is also the food that has been more involved in food poisoning associated with *Bacillus cereus*.

The main objective of this research, conducted at SGS, is the implementation of a methodology that allows the search and enumeration of *Bacillus cereus* in rice and cereal products. This methodology is based on a specific procedure (EN ISO 7932:2005), giving faster results than the traditional method (ISO 7932:2004) and was developed by Bio-Rad®.

The results of the tests performed on the 15 food samples, which includes colony counts on MYP® and BCM® petri dishes, visualization of the production of  $\beta$ -Hemolysin in blood agar -5%- (Bio-Rad®) and biochemical profile results identified in API 50 CH® and API 20 E® galleries (BioMérieux ®) were in agreement in both methods, which allows for the new implemented method being validated.

**Keywords:** Food Toxi-infections; *Bacillus cereus*; Rice; Implementation Method; EN ISO 7932:2005.



## ÍNDICE DE MATÉRIAS:

<b>1. OBJECTIVO E PLANIFICAÇÃO DO TRABALHO:</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>3</b>
2.1 Enquadramento teórico:	3
2.2 <i>Bacillus cereus</i> :	7
2.2.1 Descrição geral:	7
2.2.2 Patogenicidade Gastrointestinal:	11
2.2.2.1 Síndrome diarreica:	13
2.2.2.2 Síndrome emética:	16
2.2.3 Patogenicidade Não Gastrointestinal:	17
3.2.3.1 Infecções do Trato respiratório:	18
2.2.3.1 Infecções Nosocomiais:	18
2.2.3.2 Infecções oculares - Endoftalmites:	20
2.2.3.3 Infecções do Sistema Nervoso Central:	20
2.3 Alimentos envolvidos em infecções gastrointestinais por <i>Bacillus cereus</i> :	22
2.3.1 Alimentos contaminados com <i>Bacillus cereus</i> - Casos a nível nacional:	24
2.3.2 Alimentos contaminados com <i>Bacillus cereus</i> - Casos a nível internacional:	26
2.3.3 Alimentação infantil e o <i>Bacillus cereus</i> :	29
2.3.4 <i>Bacillus cereus</i> no arroz e produtos à base de cereais:	32
2.4 Tratamento e Prevenção da contaminação:	36
2.5 Métodos de deteção das toxinas de <i>Bacillus cereus</i> :	37
2.6 O Arroz:	39
2.6.1 Produção e consumo de Arroz e outros cereais em Portugal:	41
2.6.2 Produção e consumo de Arroz e outros cereais no Mundo:	44
<b>3. CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA:</b>	<b>47</b>
3.1 Caracterização do laboratório de microbiologia	48
<b>4. METODOLOGIA:</b>	<b>51</b>

4.1	Material e métodos: .....	52
4.1.1	Amostragem: .....	52
4.1.2	Métodos: .....	54
4.1.2.1	Método horizontal para a enumeração e presunção de <i>Bacillus cereus</i> a 30 °C - ISO 7932:2004 .....	54
4.1.2.1.1	Meio BCM ( <i>Bacillus cereus Medium</i> ):.....	55
4.1.2.1.2	Meio MYP (Mossel):.....	56
4.1.3	Preparação das amostras: .....	58
4.1.3.1	Preparação da água peptonada (BPW): .....	59
4.1.3.2	Pesagem das amostras:.....	59
4.1.3.3	Contaminação das amostras:.....	60
4.1.3.4	Preparação das diluições decimais:.....	61
4.1.4	Inoculação da suspensão inicial e respetivas diluições decimais nos meios BCM e MYP e Incubação a 30°C:.....	62
4.1.5	Contagem de colónias características e Testes confirmatórios:.....	63
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO: .....</b>	<b>67</b>
5.1	Resultados das análises microbiológicas realizadas durante o desenvolvimento do trabalho.....	67
5.2	Resultados dos testes confirmatórios realizados durante o desenvolvimento do trabalho.....	73
5.2.1	Teste da hemólise- Verificação de produção de $\beta$ -hemolisina: .....	73
5.2.2	Teste API 50 CH® e API 20E®: .....	74
5.3	Análise estatística dos resultados: .....	79
5.4	Análises de registos de análises microbiológicas a <i>Bacillus cereus</i> , na empresa SGS, desde o ano de 2006 até 2013. ....	81
5.5	Ensaio Interlaboratorial: .....	86
5.5.1	Resultados do ensaio interlaboratorial: .....	87
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS:.....</b>	<b>89</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA: .....</b>	<b>91</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS: .....</b>	<b>101</b>

## ÍNDICE DE FÍGURAS:

Figura 2.1: Infecção alimentar por <i>Bacillus cereus</i> sob duas formas diferentes associada a toxinas. Adaptado de Mims et al. (2005).....	6
Figura 2.2: <i>Bacillus cereus</i> . Adaptado de <a href="http://www.realcaos.com">http://www.realcaos.com</a> . ....	7
Figura 2.3: Necrose hemorrágica (representada na seta vermelha) no cérebro devido a invasão por <i>B. cereus</i> num paciente com leucemia linfocítica. Adaptado de Bottone, 2010. ....	21
Figura 2.4: Resultado do estudo da análise microbiológica das 62 amostras de fórmulas desidratadas infantis. Círculo rosa claro represente 73 % da totalidade das amostras foram negativas, Círculo castanho claro indica a presença de <i>Bacillus cereus</i> em 27% de amostras analisadas; Percentagem da toxina produzida sublinhado a cor de laranja. Adaptado de Furtado et al., 2013. ....	30
Figura 2.5: Distribuição de veículos de alimentos em surtos verificados na EU causado pelas toxinas de <i>Bacillus</i> na UE em 2009. Seta preta realça a incidência na matriz arroz e cereais com 11,9%. Adaptado de EFSA,2009. ....	34
Figura 2.6: Gelose de sangue de ovelha semeado com <i>Bacillus cereus</i> apresentando β-hemólise ilustrado pela seta preta. Adaptado de Fundação Oswaldo Cruz, 2014. ....	39
Figura 2.7: Produção de arroz em Portugal desde o ano 2008 (círculo azul) até 2012 (círculo laranja). Adaptado de INE (2013).....	43
Figura 2.8: O Arroz foi em 2012 o segundo produto mais produzido (Círculo Laranja a realçar o arroz-Rice). Adaptado de FAOSTAT ( <a href="http://faostat.fao.org/">http://faostat.fao.org/</a> ). ....	44
Figura 2.9: A produção do arroz a nível mundial. A China, a Indonésia e a Índia são os países com uma maior produção de arroz (seta laranja). Adaptado de <a href="http://www.mapsofworld.com/">http://www.mapsofworld.com/</a> . ....	45
Figura 3.1: Logotipo da empresa SGS,S.A. Adaptado de <a href="http://www.sgs.pt/">http://www.sgs.pt/</a> .....	47
Figura 4.1: Placa de Petri distribuída com meio BCM. ....	56
Figura 4.2: Placa de Petri distribuída com meio MYP na fase de solidificação dentro da câmara de fluxo laminar. ....	58
Figura 4.3: Algumas das 15 amostras analisadas antes de ser preparada a suspensão inicial para deteção de <i>Bacillus cereus</i> (imagem do lado esquerdo). Algumas das 15 amostras após se ter pesado a suspensão inicial (imagem do lado direito). ....	60
Figura 4.4: Amostra 1, 3, 7 e 9 após contaminação com o <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778. ....	60
Figura 4.5: <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 em Placa de Gelose de sangue (crescimento após 24 horas a 30 °C). ....	61

Figura 4.6: Esquema da preparação das diluições sucessivas, executados em cada uma das amostras estudadas; Quadrado verde: Saco <i>Stomacher</i> com 25,0 g de cada amostra (amostra1 a amostra15) mais 225 mL de BPW® (água peptonada); Seta preta: retirou-se x mL do anterior para o seguinte; $x = 1$ ou $x = 0,1$ ; Cilindro castanho: Tubo de ensaio com 9 mL de BPW® (água peptonada); Círculo de cor Salmão: Placa BCM® ( <i>Bacillus cereus</i> Medium); Círculo de cor Rosa escura: Placa MYP® (Mossel).....	62
Figura 4.7: Espalhamento do inóculo (da suspensão inicial) na placa MYP®. ....	63
Figura 4.8: Placas de MYP e BCM na estufa (Binder) de $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ após inoculação da amostra a partir das diluições seriadas.....	63
Figura 4.9: Placa de Mossel com colônias de <i>Bacillus cereus</i> . Adaptado de <a href="http://www.solabia.fr/">http://www.solabia.fr/</a> . ....	64
Figura 4.10: API 50 CH® (lado esquerdo) API 20 E® (lado direito) ambos preenchidos com a suspensão respetiva. ....	65
Figura 5.1: Colónias incontáveis de <i>Bacillus cereus</i> em Placa de MYP® (à direita) e BCM® (à esquerda), diluição $10^{-2}$ . Seta preta: Crescimento abundante de colônias; Seta roxa: meio totalmente rosa devido à elevada carga de UFC/g de alimento. ....	69
Figura 5.2: Colónias características de <i>Bacillus cereus</i> , diluição $10^{-4}$ , no meio MYP® (à esquerda) e BCM® (à direita). Ampliada 3x e 4x, respetivamente. Seta preta: Colónias características de <i>B. cereus</i> . ....	70
Figura 5.3: Colónias típicas de <i>B. cereus</i> com tonalidade rosa e forma irregular (circulo verde), formação de halo à volta da colónia devido à degradação da lecitina (circulo castanho). ....	71
Figura 5.4: 1- Placa de BCM® inoculada com Amostra 12 (Arroz com peixe) após 24 horas a $30^{\circ}\text{C}$ ; 2- Placa de BCM® inoculada com Amostra 10 (Farelo de trigo) após 24 horas a $30^{\circ}\text{C}$ ; 3- Placa de MYP® inoculada com Amostra 12 (Arroz com peixe) após 24 horas a $30^{\circ}\text{C}$ ; 4- Placa de MYP® inoculada com Amostra 8 (Farelo integral com centeio) após 24 horas a $30^{\circ}\text{C}$ ; Seta preta- Crescimento de outros microrganismos que não <i>Bacillus cereus</i> . ....	72
Figura 5.5: Amostra 8, farinha integral com centeio, Placa BCM, diluição $10^{-2}$ ; Seta preta: Indicação de fungos filamentosos. ....	72
Figura 5.6: Galeria API 50 CH® antes (lado esquerdo) de ser incubada e após 48 horas (lado direito) de incubação a $30^{\circ}\text{C}$ . Preenchimento vermelho: teste negativo; Preenchimento amarelo e preto: Teste positivo. ....	75
Figura 5.7: Galeria API 20 E® antes (figura superior) de ser incubada e após 48 horas (figura inferior) de incubação a $30^{\circ}\text{C}$ . Os testes positivos foram ADH-L-arginina, GEL-Gelatina (origem bovina) e GLU-D-glucose. O primeiro tubo, sem substrato serve de controlo negativo.....	76
Figura 5.8: Resultado em percentagem do perfil da leitura das galeria API 50 CH® e API 20 E® após 24 horas. +:Teste positivo; -:Teste negativo; Linha vermelha escura: percentagem de	

identificação de *Bacillus mycoides*; Linha roxa: percentagem de identificação de *Bacillus cereus* 2; Linha laranja: percentagem de identificação de *Bacillus cereus* 1. .... 76

Figura 5.9: Resultado em percentagem do perfil da leitura das galeria API 50 CH® e API 20 E® após 48 horas.+:Teste positivo; -:Teste negativo; Linha vermelha escura: percentagem de identificação de *Bacillus mycoides*; Linha roxa: percentagem de identificação de *Bacillus cereus* 2; Linha laranja: percentagem de identificação de *Bacillus cereus* 1. .... 77

Figura 5.10: Resultado da utilização de diferentes substratos da galeria API 50 CH® (microtubos 0-49) e API 20 E® (microtubos ONPG,ADH,LDC,ODC,CIT,H<sub>2</sub>S,URE,TDA,IND,VP,GEL,NIT) após 48 horas (imagem à esquerda); Resultado em percentagem do perfil da leitura das galeria API 50 CH® e API 20 E® após 48 horas (imagem à direita). +:Teste positivo; -:Teste negativo Linha vermelha escura: percentagem de identificação de *Bacillus subtilis* (Imagem à direita). .... 88





## ÍNDICE DE TABELAS:

Tabela 2.2: Características diferenciais de espécies do grupo de <i>Bacillus cereus</i> (Adaptado de: Rhodehmel & Hamon (1995) e Claus & Berkeley (1986)).	9
Tabela 2.3: Valores guia para avaliação da qualidade microbiológica de limentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração (Adaptado de: INSA,2005).	11
Tabela 2.4: Termos usados para descrever infeções no trato gastrointestinal (Adaptado de Mims et al., 2005).	12
Tabela 2.5: Características das toxinfecções alimentares causadas por <i>Bacillus cereus</i> (Adaptado de Granum & Lund, 1997).	13
Tabela 2.6: Propriedades físicas das enterotoxinas HBL, NHE, bceT, entFM, cytK- (Adaptado de Beecher & Wong, 1994; Arnesen et al., 2008; Lund & Granum, 1996; Scharaft & Griffiths, 2006)	15
Tabela 2.7: Propriedades físicas da cereulida (Adaptado de Agata et al. (1995) e Ehling-Schulz et al. (2006))	17
Tabela 2.8: Infeções nosocomiais por <i>Bacillus cereus</i> , de 1993 a 2009 (adaptado de Bottone, 2010).	19
Tabela 2.9: Surtos confirmados por vários agentes etiológicos incluindo <i>Bacillus cereus</i> entre 1960 e 2008.	28
Tabela 2.10: <i>Bacillus cereus</i> e outros <i>Bacillus</i> spp. em alimentos”. Adaptado de EFSA, 2005.	35
Tabela 2.11: Fatores/limites de crescimento do <i>Bacillus cereus</i> . Adaptado de Forsythe, 2002.	37
Tabela 2.12: Os teores de nutrientes de variedades de arroz. Adaptado de FAO, 2004.	40
Tabela 2.13: Valores aproximados em toneladas (t) da produção de arroz em Portugal desde 2002 até 2012; Fonte: <a href="http://faostat.fao.org/">http://faostat.fao.org/</a>	42
Tabela 2.14: Produção de cereais em Portugal desde 2010 a 2012. Adaptado de INE (2013).	43
Tabela 2.14: Produção de cereais em Portugal desde 2010 a 2012. Adaptado de INE (2013) (Continuação).	44
Tabela 4.1: Identificação e descrição das amostras analisadas para a deteção de <i>Bacillus cereus</i> no estágio curricular.	53
Tabela 5.1: Resultados obtidos pelo método ISO 7932:2004 e EN ISO 7932:2005 expressos em Log UFC/g.	68
Tabela 5.2: Resultado obtido no teste de hemólise em placa COS® - Amostra 1, 3, 7 e 9. Seta preta: Atividade hemolítica do <i>Bacillus cereus</i> (amostra 1, 3, 7 e 9).	74

Tabela 5.3: Dados analíticos do t-Test: Testes para a média populacional e para a comparação de duas médias (Método 1 e método 2). .....	80
Tabela 5.4: Análise estatística dos dados analíticos segundo ANOVA.....	80
Tabela 5.5: Amostras positivas de <i>Bacillus cereus</i> de um total de 7011 amostras analisadas entre o período de 2006 a 2013. Adaptado de SGS, 2014.....	81
Tabela 5.6: Valores guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração (adaptado de: INSA,2005).....	85

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS:

**ADN**- Ácido Desoxirribonucleico

**ANIA** -Associação Nacional dos Industriais de Arroz

**ASAE**- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

**bceT**- *Bacillus cereus* enterotoxina T

**BCM**-*Bacillus cereus* Medium

**BPW**-*Buffered peptone water*

**CDC** -*Centers for Disease Control and Prevention*

**CHO** -*Chinese hamster ovary*

**COS**- Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro

**cytK** - Cytotoxina K

**EFSA**-*The European Food Safety Authority*

**ELISA** -*Enzyme-linked immunosorbent assay*

**entFM**- enterotoxina FM

**EUA**- Estados Unidos de América

**EU**- União Europeia

**FAO** -Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas

**GLU** – Glucose

**HT**- *hydroxytryptamine*

**HBL**- Hemolisina BL

**INE**- Instituto Nacional de Estatística

**ISO** -*Internacional Organization for Standartization*

**IND**- Indol

**INSA**- Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

**IPAC**-Instituto Português de Acreditação

**JECFA** -Peritos em Aditivos Alimentares

**LRIL** -*rabbit ileal-loop test*

**MYP** -*Mannitol-Egg Yolk-Polymyxin Agar*

**Nhe** -enterotoxina não-hemolítica

**NP**- Normas Portuguesa

**OMC** -Organização Mundial do Comércio

**OMS**- Organização Mundial de Saúde

**pH**- potencial de hidrogénio

**PCR**- Reação em cadeia da polimerase

**RASFF** -*Rapid Alert System for Food and Feed*

**RPLA** -*Reversed Passive Latex Agglutination*

**RNMBP** -Recém Nascido de Muito Baixo Peso

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**SGS**-Sociedade Geral e Superintendência

**SPP** - Comissão Organizadora da Seção de Neonatologia da Sociedade Portuguesa de Pediatria

**TDA**-*tryptophan deaminase*

**UFC**- Unidade Formadora de Colónias

**UHT**- *Ultra-High Temperature*

**UI**- Unidade Internacional

**VP** -Permeabilidade Vascular

## 1. OBJECTIVO E PLANIFICAÇÃO DO TRABALHO:

Pretende-se com este trabalho que seja implementada uma metodologia para determinação de *Bacillus cereus* em matrizes alimentares (nomeadamente arroz e produtos à base de cereais). O *Bacillus cereus* é uma bactéria beta hemolítica Gram-positiva, de forma cilíndrica e endêmica, que habita nos solos. Algumas estirpes são prejudiciais aos seres humanos e causam intoxicações alimentares.

A presença de grande quantidade de microrganismos ( $\geq 10^6$ ) no alimento é indicativo de crescimento e proliferação do organismo representando portanto um perigo para a saúde pública. Este microrganismo é reconhecido como um agente etiológico de doenças de origem alimentar há mais de 40 anos. A metodologia a implementar (EN ISO 7932:2005) tem por base um procedimento específico, dando resultados com maior rapidez que o método tradicional (ISO 7932:2004) e foi desenvolvido pela empresa Bio-Rad®.

Os objetivos deste trabalho de investigação, que serão realizados na empresa SGS, são:

- Implementar a metodologia que permite a pesquisa e enumeração de *Bacillus cereus*;
- Analisar em matrizes alimentares (nomeadamente arroz e produtos à base de cereais) a possível contaminação por *Bacillus cereus*;
- Avaliar os resultados obtidos na pesquisa de *Bacillus cereus* em diversas matrizes, desde 2006 até 2013 e comparar os resultados obtidos com a literatura a nível nacional e internacional.

No **Capítulo 1** é descrito os objetivos da dissertação, faz-se o plano do trabalho e é apresentada a estrutura do mesmo.

O **capítulo 2** aborda a revisão bibliográfica referente aos temas estudados durante o desenvolvimento do trabalho. Este capítulo é iniciado com uma introdução ao tema deste trabalho, sublinhando a sua importância. Seguidamente descreve-se no geral o *Bacillus cereus*, a sua patogenicidade gastrointestinal e não gastrointestinal, os alimentos contaminados com *Bacillus cereus* nomeadamente casos a nível nacional e internacional. A importância do *Bacillus cereus* na alimentação infantil também é descrita neste capítulo. Continuamente os métodos de deteção das toxinas de *Bacillus cereus* são referidos bem como os tratamentos e a prevenção deste agente etiológico. Este capítulo termina com a ênfase da importância do arroz, que é a matriz estudada nesta dissertação.

O **Capítulo 3** descreve a empresa Sociedade Geral de Superintendência, S.A. – SGS bem como o laboratório de microbiologia onde foi realizado o estágio.

No **Capítulo 4** é apresentada toda a metodologia que permitiu a posterior validação do método implementado na empresa. Neste capítulo são descritos o método horizontal para a enumeração e presunção de *Bacillus cereus* a 30°C - ISO 7932:2004 e EN ISO 7932:2005.

No **capítulo 5** denota todos os resultados obtidos no desenvolvimento experimental assim como a sua devida discussão. Os resultados descritos abrangem todos os diferentes testes realizados nas 15 amostras tais como a contagem de colónias em placa de MYP® e BCM®, presença ou ausência de hemólise em agar sangue -5%- (Bio-rad®), bem como os resultados do perfil bioquímico identificados através dos testes em galerias API 50 CH® e API 20 E® (BioMérieux®).

No **capítulo 6** estão apresentadas as principais conclusões acerca do trabalho desenvolvido.

O **capítulo 7** engloba todas referências bibliográficas aplicadas neste trabalho.

Por fim o **capítulo 8** denota os anexos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Enquadramento teórico:

O número crescente e a gravidade das doenças de origem alimentar a nível mundial têm aumentado consideravelmente o interesse do público e das entidades governamentais em relação à segurança alimentar. Este número de doenças pode atingir até 30% da população em países desenvolvidos (WHO, 2006). Qualquer pessoa está em risco de contrair este tipo de enfermidades, geralmente de natureza infecciosa ou tóxica, provocadas por agentes que entram no organismo através da ingestão de alimentos (Forsythe, 2002).

O grande desafio atual do sector alimentar é o de restabelecer a confiança dos consumidores, dando-lhes a conhecer todas as medidas de prevenção e controlo utilizadas nas atividades de manuseamento e apreciação de alimentos. Esta é uma preocupação partilhada ao nível do Estados Membros da União Europeia, tendo sido publicada a legislação comunitária, da qual é representativo o Regulamento (CE) 853/2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios, que é de cumprimento obrigatório desde 1 de Janeiro de 2006.

Atualmente existe uma procura crescente por parte dos consumidores de alimentos frescos e minimamente processados que possuam uma garantia de segurança absoluta. No entanto, este conceito pode ter várias definições, dependendo do que se considera um risco significativo. O público em geral pode considerar que os alimentos seguros correspondem a um risco igual a zero, enquanto um produtor de alimentos deve considerar o que é um risco aceitável. Um risco nulo é impraticável dada a quantidade de produtos alimentícios disponíveis, a complexidade da cadeia de produção e distribuição e inerentes à manipulação de alimentos (Jouve et al., 1998; Forsythe, 2002).

Embora genericamente conhecidas, como toxinfecções alimentares, as doenças transmitidas por alimentos são classificadas como infeções, intoxicações ou toxinfecções (Forsythe, 2002). Uma infeção transmitida por alimentos é uma doença que resulta da ingestão de alimentos contendo microrganismos vivos prejudiciais, tais como *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Listeria* spp. e *Salmonella* spp. Por sua vez, as toxinfecções podem ser causadas por alimentos quando as toxinas estão presentes no alimento ingerido, mesmo que os microrganismos, que deram origem a essas toxinfecções, tenham sido eliminados.

O *Bacillus cereus* também pode causar muitas infeções e intoxicações. Para além das infeções de origem alimentar (não de declaração obrigatória), este agente etiológico pode causar septicémia, meningite, gangrenas, abscesso pulmonar, endocardite, infeções oculares e morte infantil (INSA, 2009).

Os cereais, em especial o arroz, o trigo e o milho, constituem a base da alimentação humana, contribuindo com cerca da metade da ingestão energética e proteica dos indivíduos (Young & Pellett, 1994). No caso do arroz, estima-se que este contribua com aproximadamente 20% e 15% do consumo mundial de energia e de proteína, respetivamente (Kennedy & Burlingame, 2003).

Há milhares de anos que o Homem cultiva cereais, como um alimento básico da sua alimentação. Antes de serem introduzidos no Norte da Europa, foram cultivados pelos antigos Babilónicos, Egípcios, Gregos e Romanos. Um dos maiores benefícios trazidos pelos cereais foi a possibilidade de serem armazenados durante todo o ano, de modo a que as comunidades primitivas pudessem semear e cultivar as suas próprias colheitas num mesmo local, em vez de serem forçados a andar sempre a mudar de local, para procurarem novos terrenos de caça. Os cereais são colhidos em todo o mundo. Desde o desenvolvimento da panificação, os cereais tornaram-se não só uma parte essencial da alimentação, mas também uma mercadoria para ser vendida e mesmo usada como moeda de troca. Com a revolução industrial do século XIX, o rendimento das culturas aumentou notoriamente e permitiu o desenvolvimento de novas técnicas de colheita e de fabrico de produtos derivados dos cereais.

As contaminações microbiológicas podem ocorrer em todas as etapas pelas quais passam os produtos agrícolas, desde a colheita até o processamento, embalagem, transporte e expedição. Estas contaminações também podem surgir por diversos meios de contacto tais como o solo, a água ou o ar, incluindo os diversos contactos físicos, mecânicos ou manuais. No entanto, o desenvolvimento microbiano depende do tipo de substrato em que se constitui o alimento, ou seja, das condições de desenvolvimento biológico que o produto oferece, notadamente relacionado com o armazenamento, à disponibilidade de água necessária aos processos metabólicos (Ferreira et al., 2004).

Segundo Colak e colaboradores, durante a produção, os cereais estão sujeitos a diversas contaminações microbiológicas, cuja proliferação pode ocorrer ao longo do ciclo produtivo. Nos campos de cultivo de cereais podem estar presentes na microflora diversas bactérias, tais como os *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*. No entanto, atualmente as técnicas de colheita e de armazenamento, são excelentes barreiras à proliferação da contaminação microbiana, presente durante a produção (Colak et al., 2012).

Após os cereais passarem pela fase de conservação, os microrganismos que resistem aos métodos de conservação são os *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Enterobactérias* a uma  $a_w$  de cerca de 0,68. Antes da moagem, as etapas de aspiração e seleção são determinantes para a redução da carga microbiana dos grãos dos cereais. No início da moagem, a qualidade da água usada é muito importante. Os níveis microbiológicos da farinha na etapa final, depende da conjugação de vários fatores. Nas farinhas, o crescimento de microrganismos é baixo (<12%), podendo



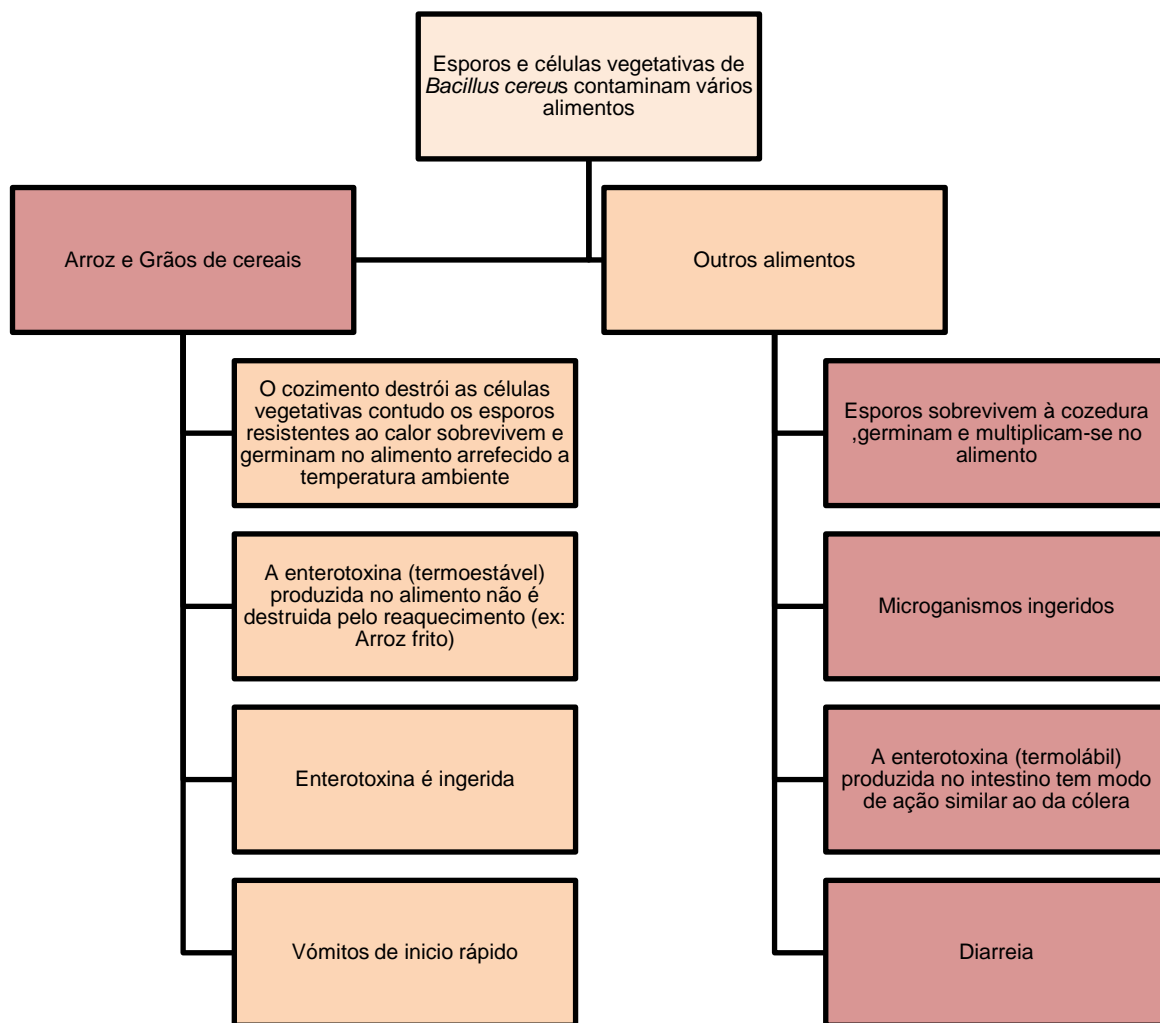
ocorrer o desenvolvimento de espécies xerófilas de leveduras e de fungos filamentosos. As condições de conservação são determinantes para os níveis microbiológicos das farinhas.

Na microflora da farinha, pode-se encontrar grupos microbiológicos de Coliformes, *Bacillus cereus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Salmonella*.

Segundo a portaria n.º905/90 de 26 de Setembro, o arroz destinado a transformação industrial e o arroz destinado a consumo devem apresentar características organolépticas próprias do produto, designadamente quanto à coloração, serem adequados ao fim a que se destinam, apresentarem-se em conveniente estado de conservação, limpos, não conspurcados nem com sinais de parasitação vegetal ou animal, de predadores vivos ou seus dejetos, isentos de cheiros ou sabores estranhos e de agentes patogénicos ou de substâncias derivadas de microrganismos em níveis que representem risco para a saúde humana.

O quadro clássico da síndrome emética (Figura 2.1) causada pelo *Bacillus cereus* inclui o arroz cozido com bastante antecedência, não refrigerado, e depois novamente aquecido ou frio imediatamente antes de ser servido. Os esporos de *Bacillus cereus* resistem ao cozimento e podem portanto germinar, crescer e produzir a toxina emética durante a permanência do arroz à temperatura ambiente. Outros produtos alimentares foram postos em causa nas intoxicações alimentares deste tipo, tais como puré de batatas, macarrão e natas, no entanto o arroz continua a ser o veículo mais frequente de intoxicação. Ignora-se as razões que favorecem, no arroz, as estirpes eméticas de *Bacillus cereus* em detrimento das estirpes diarreicas. Mesmo se o arroz for frito ou aquecido em seguida, a toxina não é destruída devido à sua grande estabilidade (Lacasse, 1995).

Os esporos da estirpe *Bacillus cereus* responsável pela síndrome diarreica (Figura 2.1) estão presentes num grande número de produtos, entre os quais legumes, produtos à base de cereais, os derivados de leite, os condimentos, os molhos e em pequena quantidade na superfície da carne. Após o cozimento e pasteurização, uma permanência do produto alimentar à temperatura ambiente favorável, variando entre os 25°C e 30°C, permite aos esporos germinar e produzir uma população bacteriana suficientemente importante para induzir a síndrome diarreica se o consumo do produto se fizer sem aquecimento prévio. Pode tratar-se de legumes cozidos, sopas, saladas, puré de batatas, cereais, carnes cozidas e diversos pratos cozinhados, assim como cremes, pudins ou molhos (Lacasse, 1995).



**Figura 2.1:** Infecção alimentar por *Bacillus cereus* sob duas formas diferentes associada a toxinas. Adaptado de Mims et al. (2005).

A primeira pesquisa epidemiológica importante sobre a síndrome diarreica foi estabelecida em Oslo, na Noruega, de 1947 a 1949 por Hauge. Tratava-se de quatro episódios semelhantes de intoxicação alimentar ocorridos em três hospitais e numa casa de convalescença (mais de 600 casos no total). O veículo alimentar era, em todos os casos, molho de baunilha preparada na véspera e não refrigerada. O exame microbiológico das amostras de molho acusou populações de *Bacillus cereus* que variavam de 25 a 110 milhões por grama. No entanto, a comunidade científica da época permanecia séptica quanto à responsabilidade da bactéria, ainda não reconhecida como possível causa de toxinfecção alimentar. Para fornecer provas irrefutáveis quanto à responsabilidade desta bactéria, Hauge decidiu inocular o molho de baunilha estéril com bactérias isoladas das toxinfecções precedentes.

Após incubação de 24 horas a temperatura ambiente, o próprio autor da pesquisa consumiu 200 mL do molho, que continha mais de 900 milhões de células de *Bacillus cereus* por grama. Ao fim de 13 horas os sintomas apareceram, caracterizados por câibras abdominais

e diarreia. Prosseguiu em seguida a sua experiência com voluntários do seu laboratório, utilizando desta vez molho estéril inoculado com bacilo isolado das suas fezes. Os resultados obtidos foram similares (Lacasse,1995).

## **2.2 *Bacillus cereus*:**

### **2.2.1 Descrição geral:**

O *Bacillus cereus* é um bacilo Gram-positivo, produtor de esporos, e que pertence à família *Bacillaceae* (Figura 2.2).



**Figura 2.2:** *Bacillus cereus*. Adaptado de <http://www.realcaos.com>.

Tem como reservatório natural o solo e apresenta uma distribuição ubiqüitária na natureza. Dada a sua presença ampla e generalizada no ambiente, pode ser isolado de uma grande variedade de matérias-primas e alimentos processados (Rajkowski & Bennett, 2003). Quando os nutrientes essenciais são raros o *Bacillus cereus* forma células especializadas de “repouso” denominadas por esporos (células desidratadas altamente resistentes com paredes espessas e camadas adicionais). Os esporos são formados dentro da membrana celular bacteriana pelo processo de esporulação ou esporogênese. Quando são libertados no ambiente, podem sobreviver a temperaturas extremas, falta de água e exposição a muitas substâncias químicas tóxicas e à radiação (Tortora,2003).

A temperatura ótima de multiplicação de *Bacillus cereus* varia de 25 °C a 37 °C, mas já foram identificadas estirpes psicotrópicas e termofílicas capazes de multiplicar entre 3 °C e 75°C (Kramer & Gilbert, 1989; Drobniowski, 1993; Dufrenne et al., 1995). A temperatura mínima

de desenvolvimento de *Bacillus cereus* é de 4 °C e a máxima é de 55 °C (Baptista et al., 2003). Os mecanismos de adaptação de *Bacillus cereus* às condições ambientais são muito diversos e contribuem para a sua sobrevivência e disseminação no ambiente (Carlin et al., 2010).

Nos últimos anos tem-se assistido ao aumento da importância deste patogénico, enquanto agente oportunista, nomeadamente em doentes imunocomprometidos e pacientes debilitados (Hilliard et al., 2003). O isolamento de níveis elevados de *Bacillus cereus* tem sido relacionado com situações de intoxicação alimentar. Apesar de esta espécie ser a mais associada a toxinfecções alimentares, outras pertencentes ao mesmo género, como o *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, e *Bacillus brevis* também foram relacionados com alguns surtos.

O termo não taxonómico “grupo *Bacillus cereus*” é utilizado para fazer referência a um grupo de microrganismos cuja taxonomia ainda hoje é motivo de estudo e bastante controversa. Alguns autores sugerem que estas espécies, por estarem tão proximamente relacionadas, devem ser agrupadas como membros de uma única espécie (Hendriksen et al., 2006; Didelot et al., 2009). O grupo *Bacillus cereus* (Tabela 2.2), também denominado *Bacillus cereus sensu lato*, compreende *Bacillus cereus sensu stricto* e outras cinco espécies estreitamente relacionadas: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* e *Bacillus weihenstephanensis* (Lechner et al., 1998; Jensen et al., 2003; Bartoszewicz et al., 2008; Guinebretiere et al., 2008; Senesi & Ghelardi, 2010).

**Tabela 2.1:** Características diferenciais de espécies do grupo de *Bacillus cereus* (Adaptado de: Rhodehmel & Hamon (1995) e Claus & Berkeley (1986)).

Propriedade	<i>B. cereus</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. anthracis</i>
Coloração de Gram	<sup>+</sup> <sup>(1)</sup>	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Lecitinase	±	±	±	±
Ácido a partir de manitol	-	-	-	-
Glicose por via anaeróbia	+	+	+	+
Motilidade	<sup>±</sup> <sup>(2)</sup>	- <sup>(3)</sup>	±	-
Hemólise em sangue de carneiro	+	+	+	-
Produção de cristais tóxicos	-	-	+	-
Redução do nitrato	+	+	±	+
Reação Voges-Proskauer (VP)	+	+	+	+
Decomposição de tirosina	+	±	+	- <sup>(4)</sup>
Resistência à lisozima	+	+	+	+
Utilização de citrato	+	+	+	+

+: Positivo;-: Negativo;±: 50% das estirpes são positivas; 1- 90 a 100% das estirpes são positivas; 2- 50 a 90 % das estirpes são positivas; 3- 90 a 100% das estirpes são negativas; 4- as maiorias das estirpes são negativas.

O *Bacillus cereus* consegue crescer em ambientes com valores de pH entre 5,0 e 9,3, embora ambientes com pH 5,1, resultante da presença de 0,1% de ácido acético, possam inibir o crescimento. A taxa específica de crescimento máxima atinge-se em ambientes com valores de pH entre 6,0 e 7,0. A toxina emética é estável para valores de pH entre 2 e 11. A toxina diarreica é instável para valores inferiores a 4 e superiores 11. Este patogénico cresce em ambientes com valores de  $a_w$  mínimos compreendidos entre 0,92 e 0,95. Os esporos resistem por longos períodos em alimentos desidratados (com baixo  $a_w$ ). Para concentrações superiores a 7,5% de NaCl o crescimento de *Bacillus cereus* é inibido. Em relação à presença de oxigénio a *Bacillus cereus* é uma bactéria anaeróbia facultativa, mas a produção de toxinas é muito baixa em condições de anaerobiose. Contudo, relativamente à radiação os esporos de *Bacillus cereus* são mais resistentes às radiações do que as células vegetativas (Forsythe, 2002).

Os surtos associados ao *Bacillus cereus* estão relacionados com a ingestão de molhos, chouriços, sopas, assados no forno, arroz, massas e saladas. A presença de grande quantidade de microrganismos ( $\geq 10^6$ ) no alimento é indicativo de crescimento e proliferação do organismo e consistente com um potencial perigo para a saúde. Na confirmação laboratorial da enterotoxina emética/diarreica faz-se o isolamento da bactéria nas fezes do doente ou então o isolamento de  $\geq 10^5$  colónias/g no alimento epidemiologicamente implicado (Viegas, 2009).

Após os resultados obtidos da confirmação laboratorial poderá ser comparado o grau de toxicidade com os valores guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração (Tabela 2.3), sendo incluídos no **Grupo 1** – Refeições, sandes, bolos ou sobremesas doces com ingredientes totalmente cozinhados, ou adicionados de especiarias, ervas aromáticas secas ou desidratadas ou tratadas por radiação ionizante, de produtos UHT (*ultra-high temperature*) e de maionese industrializada; **Grupo 2** - Refeições, sandes, bolos ou sobremesas doces cozinhados adicionadas de ingredientes crus e /ou com flora específica própria (exemplos: saladas frias, pratos de carne ou peixe com saladas cruas, etc.) e por fim o **Grupo 3** – Saladas, vegetais e frutos crus.

Estes dados foram obtidos pelo INSA ao longo dos anos que permitem agrupar os alimentos prontos a comer em três grupos diferentes, de acordo com o tipo de ingredientes que entram na sua composição, o tratamento térmico ou outro procedimento que lhe é aplicado.

**Tabela 2.2:** Valores guia para avaliação da qualidade microbiológica de limentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração (Adaptado de: INSA,2005).

Microrganismo	Grupo de alimentos	Qualidade microbiológica (UFC/g quando não indicado)			
		Satisfatório	Aceitável	Não Satisfatório	Inaceitável / potencialmente perigoso
<b><i>Bacillus cereus</i></b>	1,2 e 3*	$\geq 10^2$	$\geq 10^2 \leq 10^3$	$> 10^3 < 10^5$	$\geq 10^5$

\* **Grupo 1** – Refeições, sandes, bolos ou sobremesas doces com ingredientes totalmente cozinhados, ou adicionados de especiarias, ervas aromáticas secas ou desidratadas ou tratadas por radiação ionizante, de produtos UHT (*ultra-high temperature*) e de maionese industrializada; **Grupo 2** - Refeições, sandes, bolos ou sobremesas doces cozinhados adicionadas de ingredientes crus e /ou com flora específica própria (exemplos: saladas frias, pratos de carne ou peixe com saladas cruas, etc.) e por fim o **Grupo 3** – Saladas, vegetais e frutos crus.

### 2.2.2 Patogenicidade Gastrointestinal:

A ingestão de agentes patogênicos pode causar inúmeras infecções distintas. Estas podem estar restritas ao trato gastrointestinal ou terem início no intestino antes de se disseminarem por outras partes do corpo. Um largo espectro de agentes patogênicos microbianos é capaz de infectar o trato gastrointestinal através de alimentos, mãos ou fluidos contaminados com fezes por via fecal-oral. Para uma infecção ocorrer o agente patogênico deverá ser ingerido em quantidade adequada ou possuir atributos para escapar das defesas do hospedeiro no trato gastrointestinal superior e por fim alcançar o intestino. No intestino o agente bacteriano permanece localizado e provoca doença como resultado da multiplicação e/ ou da produção de toxina. Os agentes também podem invadir a mucosa intestinal para alcançar os vasos linfáticos ou a corrente sanguínea. Os efeitos destrutivos resultantes da infecção do trato gastrointestinal (Tabela 2.4) são a gastroenterite, diarreia, disenteria, enterocolite (Mims et al., 2005).

**Tabela 2.3:** Termos usados para descrever infecções no trato gastrointestinal (Adaptado de Mims et al., 2005).

Termos usados para descrever infecções no trato gastrointestinal
<b><u>Gastroenterite:</u></b> Uma síndrome caracterizada por sintomas gastrointestinais incluindo náuseas, vômitos, diarreia e desconforto abdominal.
<b><u>Diarreia:</u></b> Liberação de fezes anormais, caracterizadas por evacuações frequentes e ou líquidas; em geral resulta de doença no intestino delgado e envolve perda aumentada de fluidos e eletrólitos.
<b><u>Disenteria:</u></b> Distúrbio inflamatório do trato gastrointestinal frequentemente associado a sangue e pus nas fezes e acompanhado por sintomas de dor, febre, cólicas abdominais; Em geral este distúrbio é resultante da doença no intestino grosso.
<b><u>Enterocolite:</u></b> Inflamação da mucosa do intestino delgado e grosso.

As intoxicações causadas por *Bacillus cereus* resultam da ingestão de alimentos contaminados com o microrganismo e/ou com as enterotoxinas que produziu durante o seu crescimento. As intoxicações associadas a este microrganismo são normalmente de curta duração e pouco severas, no entanto têm sido relatados diversos surtos.

A contaminação dos alimentos por *Bacillus cereus* pode ocorrer durante o manuseamento dos mesmos, processamento ou distribuição, podendo o microrganismo crescer e determinar a ocorrência de doenças de origem alimentar (Dufrenne et.al 1994), que se manifestam sob a forma de duas síndromes, uma emética, que é similar à causada pela enterotoxina produzida por *Staphylococcus aureus*, e outra diarreica, semelhante à produzida pela enterotoxina de *Clostridium perfringens* (Banwart,1989). Os fatores de virulência do *B. cereus* envolvem a formação de várias toxinas extracelulares: uma toxina diarreica termolábil, que é inativada em cinco minutos a 56°C, e uma toxina termoestável, de ação emética que se mantém inalterada após uma hora a 120°C (Bennett, 1992). A circunstância de ambas as síndromes está associada, geralmente, ao consumo de alimentos previamente submetidos a tratamento térmico, de forma que, alimentos cozidos e mantidos a temperaturas que permitam a germinação dos esporos e multiplicação das células são importantes fontes do microrganismo ou de suas toxinas (Azeredo, 1998).

O *Bacillus cereus* pode causar duas formas clínicas distintas de doença: a síndrome diarreica e a síndrome emética (Tabela 2.5) (Jackson, 1993). Estas síndromes estão relacionadas com o consumo de alimentos contaminados, sendo raros os casos que determinam a ocorrência de ambos os sintomas, no entanto os sintomas da infecção por *B.*



*cereus* são geralmente ligeiros e auto-limitados; contudo, normalmente não requer tratamento (Monteville & Matthews, 2008).

**Tabela 2.4:** Características das toxinfecções alimentares causadas por *Bacillus cereus* (Adaptado de Granum & Lund, 1997).

	Síndrome emética	Síndrome diarreica
<b>Dose infetante</b>	$10^5$ - $10^8$ Células/grama de alimento	$10^5$ - $10^7$ Células/grama de alimento
<b>Toxina produzida</b>	Pré- formada	Produzida no intestino delgado
<b>Tipo de toxina</b>	Peptídeo cíclico (1,2 kDa)	Três subunidades proteicas (L1,L2,B; 37-105 kDa)
<b>Estabilidade da toxina</b>	Muito estável (126 °C; 90 minutos; pH 2-11)	Inativadas a 56 °C durante 30 minutos
<b>Tempo de incubação</b>	0,5-6 horas	8-24 horas
<b>Duração da doença</b>	6-24 horas	12-24 horas
<b>Sintomas</b>	Dores abdominais, Vômitos e náusea	Náusea, dores abdominais, mal-estar e diarreia líquida
<b>Alimentos mais frequentemente implicados</b>	Arroz frito e cozido, massas e batatas	Produtos cárneos, sopas, produtos vegetais, peixes, pudins, molhos, leite e produtos lácteos

#### 2.2.2.1 Síndrome diarreica:

Após 4 a 16 horas de incubação do *Bacillus cereus*, no organismo, ocorre a síndrome diarreica manifestada pela dor abdominal, náuseas e pela diarreia que geralmente ocorre passadas 12 a 24 horas após a ingestão deste microrganismo. O vômito é um sintoma raro neste tipo de síndrome e na maioria dos casos a doença é autolimitada e não necessita de tratamento (Schraft & Griffiths, 2006).

A síndrome diarreica é causada por proteínas de elevado peso molecular, sensíveis a pH inferior a 4,0, sensíveis à tripsina e pronase, e termosensíveis, podendo ser inativadas se submetidas a uma temperatura de 55°C durante 20 minutos. Apesar das inúmeras pesquisas realizadas com o objetivo de isolar e caracterizar estas enterotoxinas diarreicas, são conhecidas atualmente, apenas quatro delas: a hemolisina BL (componentes B, L1 e L2), a enterotoxina não-hemolítica (Nhe), a enterotoxina K e a enterotoxina T. As propriedades físicas das enterotoxinas estão descritas na tabela 2.6. As três primeiras já foram identificadas em surtos alimentares (Bhunia, 2008). Esta síndrome provoca sintomas associados à exposição (8 -16 horas) das enterotoxinas, contudo a sintomatologia é mais comum entre a 12<sup>o</sup> e 13<sup>o</sup> hora de exposição, determinando uma duração entre 6 a 12 horas (Jay et al., 2005). Estas enterotoxinas estão associadas à esporulação bacteriana e apresentam peso molecular entre os 38 e 45 kDa (Tabela 2.6). A dose infecciosa desta síndrome é relatada como sendo pela presença de 10<sup>5</sup>-10<sup>7</sup> células por grama de alimento (Scharaft & Griffiths, 2006).

Goepfert e colaboradores em 1972 foram os primeiros a relacionar o mecanismo de patogenicidade de *Bacillus cereus*, a uma possível enterotoxina. As suas conclusões foram baseadas nos resultados do teste “*rabbit ileal-loop test*” (LRIL), no qual o acúmulo de líquido no circuito é medido após a injeção de colônias de *Bacillus cereus* ou sobrenadante de cultura das mesmas colônias (Goepfert et al., 1972). Este ensaio juntamente com a reação de permeabilidade vascular (VPR), um ensaio que marca o aumento da permeabilidade das veias de coelhos ou cobaias após injeção intradérmica de sobrenadantes de cultura de bactérias, ainda é utilizado como um ensaio de referência para avaliar a toxicidade de extratos da toxina.

Ao longo do tempo tem-se pensado que a síndrome diarreica é uma intoxicação clássica, devido à ingestão de toxina produzida durante o crescimento de *Bacillus cereus* em alimentos. No entanto, conclui-se que a doença é causada pela ingestão de células de *Bacillus cereus* que crescem e produzem uma enterotoxina no trato intestinal do paciente o que desenvolve uma toxinfecção (Granum & Lund, 1997). Esta afirmação baseia-se em três observações:

- A maioria das estirpes produzem as enterotoxinas em quantidades significativas apenas depois de atingirem as concentrações de células de 10<sup>7</sup>/mL, enquanto a dose infecciosa em muitos surtos foi definida como sendo de 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup>/mL;
- A atividade da enterotoxina exposta a um pH de 3,1, durante 20 minutos é reduzida em 80%, e a toxina está completamente destruída em 20 minutos de exposição posterior à tripsina e quimiotripsina;
- O tempo de incubação de 12-24 horas é demasiado longo para uma ação enterotoxina simples, mas várias estirpes de *Bacillus cereus* são capazes de crescer bem em condições anaeróbias a 37°C e produzir níveis significativos de enterotoxina dentro de 6 horas (Granum, 1994).

**Tabela 2.5:** Propriedades físicas das enterotoxinas HBL, NHE, bceT, entFM, cytK- (Adaptado de Beecher & Wong, 1994; Arnesen et al., 2008; Lund & Granum, 1996; Scharaft & Griffiths, 2006)

Toxina	Característica	Massa Molar	Sequencia N-terminal	Ponto Isoelétrico
Hemolisina BL (HBL)	Toxina tripartida constituída por um componente de ligação às células, a <b>B</b> (gene <i>hblA</i> ) e duas componentes responsáveis pela lise celular, a <b>L1</b> (gene <i>hblC</i> ) e a <b>L2</b> (gene <i>hblD</i> ).	<b>B-</b> 38,0 kDa	S-E-I-Q-T-N-N-G-D-T-A-L	5,340±0,012
		<b>L1-</b> 38,5 kDa	x- E-T-1-A-Q-E-Q-K-V-G-N-Y-A-L-G-P-E	5,330±0,008
		<b>L2-</b> 43,2 kDa	E-T-Q-x-E-N-M-D-I-x-S	5,330±0,016
Enterotoxina não-hemolítica (NHE)	Toxina tripartida formada por três componentes proteicos: <b>NheA</b> (gene <i>NheA</i> ), <b>NheB</b> (gene <i>NheB</i> ) e <b>NheC</b> (gene <i>NheC</i> ).	Número de aminoácidos		
		<b>NheA-</b> 41,0 kDa	360	5,13
		<b>NheB-</b> 39,8 kDa	372	5,61
		<b>NheC-</b> 36,5 kDa	320	5,28
Enterotoxina <i>B. cereus</i> (bceT)	Proteína simples (gene <i>bceT</i> )	<b>bceT-</b> 41,0 kDa	-	-
Enterotoxina <i>B. cereus</i> (entFM)	Proteína simples (gene <i>entFM</i> )	<b>entFM-</b> 45,0 kDa	-	-

**Tabela 2.6:** Propriedades físicas das enterotoxinas HBL, NHE, bceT, entFM, cytK- (Adaptado de Beecher & Wong, 1994; Arnesen et al., 2008; Lund & Granum, 1996; Scharaft & Griffiths, 2006) (Continuação).

Toxina	Característica	Massa Molar	Sequencia N-terminal	Ponto Isoelétrico
Cytotoxina K (CytK)	Proteína (gene <i>cytK</i> ) com actividade dermonecrótica, citotóxica e hemolítica, mostrando um potencial citotóxico em culturas de células semelhante à <b>HBL e NHE.</b>	<b>cytK-</b> 34,0 kDa	-	-

#### 2.2.2.2 Síndrome emética:

A síndrome emética foi identificada na década de 1970, estando relacionada com o consumo de arroz frito. Esta doença emética tem um tempo de incubação de 1-5 horas, e manifesta-se com náuseas e vômitos cuja duração varia entre as 6 e 24 horas. A diarreia é observada apenas ocasionalmente. (Kramer & Gilbert, 1989).

Esta síndrome envolve a toxina cereulida, cuja massa molecular é de 1,2 kDa. Caracterizando esta toxina, sublinha-se o facto de esta toxina não ser uma proteína antigénica, contudo é termoestável e a sua produção ocorre durante a fase estacionária de crescimento do *Bacillus cereus* (Bhunja, 2008).

A toxina envolvida na síndrome emética apresenta diferenças relativamente às toxinas que provocam a síndrome diarreica (Tabela 2.7). Essas diferenças estão ligadas ao tipo e peso molecular (peso molecular da toxina cereulida inferior às das enterotoxinas associadas à síndrome diarreica). Esta toxina é altamente resistente ao calor (a sua atividade não cessa após aquecimento a 120°C durante 1 hora). A síndrome emética está mais associada a alimentos amiláceos, principalmente arroz (Schoeni & Wong, 2005).

Neste tipo de síndrome provocada por intoxicação alimentar por *Bacillus cereus* pode-se encontrar no alimento contaminado, normalmente,  $10^5$ - $10^8$  células/g de alimento. A dose de toxina emética foi estimada em 30 µg por kg de peso corporal (Bhunja, 2008).

Nem todos os alimentos têm as condições necessárias para a produção da cereulida mesmo que o crescimento de *B. cereus* seja possível (Agata et al., 2002). O leite, o arroz e massas são alimentos que suportam a produção da cereulida a 30 °C (Finlay et al. 2002).

Mahler e colaboradores realçaram um caso grave, conduzido por esta síndrome, relacionado com um jovem de 17 anos que apresentou todos os sintomas do síndrome emético acabando por morrer de insuficiência hepática. Os autores acima mencionados relataram também que o pai desse jovem sofreu de hiperbilirrubinemia e rabdomiólise, mas conseguiu recuperar (Mahler et al., 1997).

**Tabela 2.6:** Propriedades físicas da cereulida (Adaptado de Agata et al. (1995) e Ehling-Schulz et al. (2006))

Toxina	Características	Massa Molar
<b>Cereulida</b>	Liga-se aos recetores 5-HT3 do nervo vago, no estômago, induzindo desta forma o vômito. Por outro lado, esta toxina pode também ser responsável por insuficiência hepática, uma vez que atua como um ionóforo de potássio e inibe a oxidação dos ácidos gordos alterando a atividade mitocondrial dos hepatócitos.	1,2 kDa

### 2.2.3 Patogenicidade Não Gastrointestinal:

Além de intoxicação alimentar, *Bacillus cereus* provoca uma série de infeções sistêmicas e locais, em indivíduos imunologicamente comprometidos e imunocompetentes. As infeções incluem bacteriemia fulminante, quanto ao sistema nervoso central (SNC) pode ocorrer meningite e abscessos cerebrais. Também poderá ocorrer outras patologias associadas a outros pontos anatómicos tal como endoftalmite, pneumonia e infeções cutâneas (Bottone, 2010).

### **3.2.3.1 Infecções do Trato respiratório:**

A invasão da cavidade oral é mais comum em pacientes imunodeprimidos pois o *Bacillus cereus* pode se alojar na cavidade oral do paciente através da inalação de esporos ou por bactérias vegetativas que passam através de alimentos contaminados com *Bacillus cereus* (Colpin et al., 1981). Esta patologia clínica ocorre quando as bactérias se agregam ao sulco na cavidade oral ocorrendo o desenvolvimento e ativação das toxinas do *Bacillus cereus* o que pode difundir para os tecidos adjacentes ou mesmo para outros locais do corpo.

Um relatório de Strauss e colaboradores, relativo ao desenvolvimento de traqueobronquite pseudomembranosa numa paciente de 52 anos com anemia aplástica, sugere que os danos mediados após o tratamento da mucosa bucal poderão acelerar a germinação de esporos e adesão da célula vegetativa e posterior colonização (Strauss et al., 2001).

### **2.2.3.1 Infecções Nosocomiais:**

Devido à ampla germinação de esporos de *Bacillus cereus* no solo, no pó, na água, e no ambiente hospital, o *B. cereus*, é geralmente considerado um contaminante, quando isolado a partir de danos clínicos de diferentes origens (sangue, feridas, exsudados e saliva). No entanto, foi ao longo do tempo que o *Bacillus cereus* ganhou notoriedade na causa maioritária de surtos nosocomiais (Tabela 2.8), envolvendo pacientes imunodeprimidos hospitalizados, contaminação de reservatórios ambientais tais como filtragem de ar contaminado e equipamento de ventilação (Bottone, 2010). O *Bacillus cereus* também pode ser detetado em equipamentos de fibra óptica de broncoscopia e em luvas de uso hospital, por sua vez também pode ser isolado e presenciado em mãos do pessoal profissional de saúde, cateteres intravenosos, soluções de lavagem de mãos à base de álcool, tubos de colheita de sangue periférico, balões utilizados na ventilação manual, roupa de cama e toalhas reutilizadas (caso descrito por Dohmae e colaboradores (2008), detetado no Japão).

El Saleeby e equipa relataram um caso de um paciente com 17 anos de idade, vítima de leucemia linfoblástica aguda apresentando uma diminuição no número de neutrófilos na circulação sanguínea por consequência de uma bacteriemia causada por *Bacillus cereus*. A causa da bacteriemia estava relacionada com a ingestão de chá morno. Uma investigação minuciosa por esses autores mostrou uma alta prevalência, em 17 de 19 sacos de chá, de contaminação por *Bacillus cereus* (El Saleeby et al., 2004).

**Tabela 2.7:** Infecções nosocomiais por *Bacillus cereus*, de 1993 a 2009 (adaptado de Bottone, 2010).

Ano de ocorrência	Número de pacientes afetados	Fontes de infecção
1993	16 (1 morreu)	Equipamento de ventilação contaminado
1994	2 (sem informação)	Roupa para uso hospitalar contaminada
2000	3 Neonatais (1 morreu)	Balões usados na ventilação manual contaminados; Mãos do pessoal de enfermagem contaminadas.
2000-2005	16 (sem informação)	Cateteres secos e reutilizados; Toalhas esterilizadas a vapor; Lavagem de máquinas entre as linhas de separação dos quartos hospitalares.
2003	1 (sobreviveu)	Cateter de via central contaminado; Sacos de chá contaminados; Algodão não estéril utilizado para desinfecção da pele.
2004	1 (sobreviveu)	
2006	3 (1 morreu)	
2009	18 (sem informação)	Gazes contaminadas; Pontas do cateter contaminadas; Ambiente hospitalar não estéril; Toalhas esterilizadas a vapor; Pote de armazenamento do algodão com álcool contaminado.

### 2.2.3.2 Infecções oculares - Endoftalmites:

Callegan e grupo, em 1999, relataram um caso de um paciente de 45 anos de idade, com história de diabetes *mellitus* (insulinodependente). O paciente foi intervencionado a uma catarata e após 3 dias da cirurgia apresentou vermelhidão e dor no olho esquerdo. Um diagnóstico rápido de endoftalmite foi efetuado através da técnica de coloração de Gram ao fluido vítreo, que mostrou numerosos bacilos Gram-positivos. Apesar de os antibióticos vancomicina e ceftazidima terem sido administrados por via intravenosa, a infecção progrediu. Foram executadas técnicas de diagnóstico laboratorial a culturas do fluido intraocular e ao sangue, sendo os resultados confirmatórios de presença e crescimento de *Bacillus cereus* (Callegan et al., 1999).

A endoftalmite é uma infecção ocular resultante de uma infecção microbiana traumática ou sistêmica no interior do olho. O resultado da infecção varia consoante o agente microbiano envolvido e da rapidez de resposta para o tratamento. A marca da lesão oftálmica é um abscesso de anel intracorneano acompanhado por uma rápida progressão da dor, quemose, proptose, hemorragia retiniana, e perivasculite. As manifestações sistêmicas incluem a febre, leucocitose e mal-estar geral (Martinez et al., 2007).

### 2.2.3.3 Infecções do Sistema Nervoso Central:

Vários autores têm avançado com a junção patológica entre a presença de *Bacillus cereus* no trato gastrointestinal e as infecções do sistema nervoso central (SNC). Esta relação depara-se mais frequentemente em pacientes que apresentaram sintomas gastrointestinais (náuseas, vômitos, dor epigástrica, ou diarreia) sugestivos de intoxicação alimentar antes do envolvimento com o SNC ou sintomas gastrointestinais desenvolvidos concomitantemente com envolvimento do SNC. A patogénese da infecção por *Bacillus cereus* no SNC (Figura 2.3), na maioria dos casos é obscuro, apesar de vários fatores de risco terem de ser considerados (Bottone, 2010).

O conceito reforça a aquisição de *B. cereus*, a partir de uma fonte exógena, por exemplo, a partir de alimentos ou de água, com invasão gástrica, necrose da mucosa e alastramento para o fígado e sistema nervoso central através da circulação sanguínea. O suporte para este princípio pode ser adquirido na autópsia, o que pode revelar o envolvimento do fígado (Akiyama et al., 1997).

Funada e colaboradores relataram o caso de pacientes com leucemia que desenvolveram uma septicemia fatal. Isolou-se um caso único de um paciente e analisou-se as fezes do mesmo isolando o *Bacillus cereus*. Este paciente desenvolveu uma síndrome clínica



de gastroenterite aguda, meningoencefalite com hemorragia subaracnóide e múltiplos abscessos hepáticos e infartos do fígado repleto de infiltração de *Bacillus cereus* (Funada et al., 1988).

Bottone descreveu um caso clínico que envolvia um homem de 28 anos de idade que apresentava sinais de hematomas, sangramento das gengivas e nariz e um registo de 2 semanas de diarreia sem resíduos de sangue. Através de uma análise citológica à medula óssea, o paciente foi diagnosticado com leucemia linfocítica aguda (células T), para o qual foi administrada quimioterapia por indução. Sete dias depois do tratamento, o paciente evoluiu com calafrios seguido por um episódio febril, dois dias mais tarde. Foram executadas hemoculturas onde cresceu a bactéria *Bacillus cereus*. O paciente acabou por falecer e a autópsia revelou necrose hemorrágica bilateral do cérebro, com numerosos Bacilos Gram-positivos incorporado nas áreas de necrose incluindo invasão por *B. cereus* no Sistema nervoso central (Bottone, 2010).



**Figura 2.3:** Necrose hemorrágica (representada na seta vermelha) no cérebro devido a invasão por *B. cereus* num paciente com leucemia linfocítica. Adaptado de Bottone, 2010.

A Comissão Organizadora da Seção de Neonatologia da Sociedade Portuguesa de Pediatria (SPP) do Hospital Professor Doutor Fernando da Fonseca organizou uma reunião monotemática sobre Infeciologia Neonatal com vários serviços pediátricos a nível nacional. Machado e equipa pertencente à Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais, do serviço de pediatria no Hospital de Braga, relataram um caso de Infecção por *Bacillus cereus* numa unidade de cuidados intensivos neonatais. Esta equipa deu ênfase ao tema envolvendo a sépsis como uma causa importante de morbilidade e mortalidade neonatal, principalmente nos recém-nascidos com muito baixo peso. As infeções do Sistema Nervoso Central têm uma incidência de 1,4% neste grupo. A taxa de mortalidade varia com o microrganismo, estado de imunocompetência do recém-nascido e complicações associadas. Machado e colaboradores indicam que o *Bacillus cereus* (apesar de raro) é a causa de meningoencefalite em doentes com doença grave aguda e/ou doentes imunocomprometidos, estando associado a uma mortalidade de 80% nos RNMBP (recém nascido de muito baixo peso).

O caso foi descrito sendo um recém-nascido de Gestação gemelar, pré-termo de 24 semanas, sexo feminino. O recém-nascido apresentava Sépsis nosocomial com necessidade de vários ciclos de antibioterapia. O recém-nascido iniciou a terapêutica com vancomicina, meropenem e fenobarbital. Na hemocultura foi isolado *Bacillus cereus*. Posteriormente observou-se o agravamento com necessidade de ventilação assistida. Atualmente o recém-nascido apresenta atividade espontânea diminuída e mantém hemiparésia esquerda com paralisia facial direita.

Bantados e colaboradores, em 2013, discutiram um caso clínico de bacteriemia de *Bacillus cereus* em pacientes que usam drogas intravenosas. Estes autores concluíram que o *B. cereus* não deve ser considerado como um contaminante, quando isolado a partir de pacientes que usam drogas por via intravenosa. O extenso trabalho foi fruto da conclusão de que o *B. cereus* tem manifestações clínicas diferentes e consequentes complicações. Os autores deram relevância ao tratamento antimicrobiano prolongado em pacientes com bacteriemia persistente, mesmo quando uma fonte endovascular não pode ser identificada de forma positiva (Bantados et al., 2013).

Não há nenhuma conclusão para os casos de infeções não gastrointestinais devido a *B. cereus*. Apesar de a ocorrência ser rara, o reconhecimento destes casos fazem validar a coexistência da bactéria ambiental generalizada com a flora humana. Por um lado, a bactéria evoluiu numa série de atributos relacionados com a virulência, tais como adesinas bacterianas e toxinas que permitem a sua entrada e sobrevivência dentro do hospedeiro humano e, em circunstâncias apropriadas que permite habilitá-lo e ultrapassar barreiras para produzir doença em vários compartimentos anatómicos. O grande obstáculo na avaliação da sua presença quando isolados a partir de uma amostra clínica é superar o facto de ser um contaminante insignificante que ainda está em fase de investigação, apesar de existir uma documentação global em curso acerca das infeções extraintestinais (Buttone, 2010).

### **2.3 Alimentos envolvidos em infeções gastrointestinais por *Bacillus cereus*:**

O *Bacillus cereus* encontra-se largamente distribuído na natureza, tendo já sido isolado no solo, pó, colheitas de cereais, vegetação, pêlos de animais, água e matéria em decomposição. Assim, o microrganismo é encontrado numa grande variedade de produtos agrícolas e de origem animal. Os alimentos podem ser contaminados por *Bacillus cereus* durante o manuseio, processamento ou distribuição, podendo o microrganismo crescer e determinar a ocorrência de doenças de origem alimentar (Dufrenne et al., 1994).

Os membros do grupo *B. cereus* são microrganismos ubiqüitários encontrando-se distribuídos no ambiente, principalmente devido à sua capacidade de produzir esporos. O homem não contribui significativamente como veículo de contaminação dos alimentos por

*Bacillus cereus*, embora este possa estar temporariamente presente no intestino de indivíduos saudáveis. Os animais podem ser portadores de *Bacillus cereus* no seu corpo podendo causar, ocasionalmente, mastites em vacas ([www.asae.pt](http://www.asae.pt)).

Alguns estudos têm demonstrado a habilidade do microrganismo de crescer em temperaturas de refrigeração em vários substratos (Valero et al., 2003).

Entre os alimentos mais frequentemente contaminados por *Bacillus cereus* estão os cereais, o leite cru, o leite processado termicamente (Bartoszewicz et al., 2008), as carnes, os produtos cárneos (Borge et al., 2001), as sopas, os pudins (Rhodehamel & Harmon, 1995), os alimentos desidratados, as especiarias (Chen et al., 2001), o arroz cozido ou frito (Cronin et al., 2009), os vegetais prontos a consumir, (Ouoba, et al., 2008) e também produtos nutricionais farmacêuticos (Arribas et al., 1988). A contaminação, através deste microrganismo, pode ter origem em equipamentos e utensílios utilizados na pré-preparação, preparação e distribuição dos alimentos, evidenciando que processos de limpeza e sanitização, quando realizados de maneira inadequada, podem contribuir para que estes locais sejam fontes de contaminação (Svensson et al., 2004). Alguns alimentos foram notificados pelo RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*), desde 2005, dos quais destaca-se o cacau, o leite UHT, as massas semi-frescas, a mistura de especiarias e o peixe, quanto à contaminação por *Bacillus cereus*.

O *Bacillus cereus*, como já foi referido, tem origem no solo e no pó, sendo um contaminante comum dos cereais e outros alimentos, encontrando-se à superfície dos invólucros dos grãos. As farinhas resultantes dos cereais servem de matéria-prima para o fabrico de quantiosos alimentos, especialmente na panificação e produtos de confeitaria. É um microrganismo que produz esporos termorresistentes que o tornam particularmente adaptado aos alimentos tratados termicamente, como é o caso dos produtos de confeitaria, existindo por isso a possibilidade de aparecimento neste tipo de produtos.

A ampla distribuição do microrganismo e a sua capacidade de produzir esporos resistentes a condições de secura e a temperaturas elevadas significam que alimentos prontos a serem consumidos possam conter *Bacillus cereus* pelo que requerem medidas de controlo que previnam o seu crescimento, especialmente depois de cozinhados, quando toda a flora competitiva foi eliminada. Alimentos como a carne, o leite, os vegetais e os produtos do mar têm sido implicados na intoxicação do tipo diarreica, que resulta da ingestão do alimento contaminado com a toxina pré-formada ou do alimento contaminado com a bactéria que depois de ingerida produz e liberta a toxina no intestino. À intoxicação emética, resultante da ingestão do alimento com a toxina pré-formada, têm sido associados pratos de arroz, alimentos desidratados, massas e queijo. O *Bacillus cereus* tem sido detetado em numerosas ervas desidratadas, especiarias, preparados para molhos, pudins, sopas, produtos de pastelaria e saladas (ICMSF, 1996).

### 2.3.1 Alimentos contaminados com *Bacillus cereus* - Casos a nível nacional:

Veiga e equipa da Direção de avaliação e comunicação dos riscos em Portugal, da Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), asseguraram que os dados relativos às doenças de origem alimentar em Portugal são raros, o que se transpõe numa incorreta perceção da importância relativa de cada uma das doenças. Para esta situação Veiga e equipa indicaram que a maioria das vítimas de uma infeção ou intoxicação alimentar não recorre a um profissional de saúde e, quando o faz, raramente é sujeita a análises que permitam identificar o agente responsável. Por outro lado, apenas algumas doenças de origem alimentar são de declaração obrigatória tais como a salmonelose, brucelose, botulismo, febres tifóide e paratifóide, hepatite A aguda e shigelose, o que faz com que os agentes de algumas dessas enfermidades, como a salmonelose, acabem por ser considerados os principais responsáveis pelas doenças de origem alimentar, o que pode não transpor a situação verídica. Uma das causas que pode contribuir para que o peso de *Bacillus cereus* como agente patogénico alimentar seja desconsiderado é o diagnóstico não adequado, uma vez que a doença causada por este agente pode ser confundida com outro tipo de tox infeção alimentar (Veiga et al., 2009).

As doenças infecciosas podem constituir um perigo para a comunidade. Por isso, o médico, quando tem conhecimento da ocorrência de uma dessas doenças de declaração obrigatória, deve preencher o boletim de declaração obrigatória que tem como objetivo diminuir o risco de contágio dessas doenças. Nos casos em que as doenças possam tornar-se emergência nacional ou têm um tempo útil escasso para a tomada de medidas preventivas eficazes (como as doenças de transmissão alimentar), o médico deve avisar à Autoridade de Saúde através do meio mais rápido possível. Imediatamente, a Autoridade de Saúde local implementa ou verifica as medidas necessárias para evitar o risco de contágio subsequente (<http://www.min-saude.pt/portal/>).

De acordo com os dados fornecidos e declarados no oitavo relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS), *WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe*, Portugal, no ano 1999, reportou um surto de tox infeção alimentar por *B. cereus* que atingiu sete pessoas e outro surto no ano 2000, atingindo seis pessoas.

Em Portugal, em 2009, foram registados, oficialmente, 11 surtos com origem alimentar. Do total de 251 pessoas que evidenciaram sinais de doença, resultaram 90 hospitalizações e 1 caso fatal. Os agentes etiológicos envolvidos nos casos com maior número de doentes foram *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Salmonella enteritidis* (EFSA, 2011).

Entre o ano de 2008 e de 2011 ocorreram surtos que foram reportados pela “*The European Food Safety Authority*” (EFSA) e estudados pelos laboratórios de Microbiologia do

Departamento de Alimentação e Nutrição do INSA. Porém foi enviado ao INSA géneros alimentícios para o devido estudo microbiológico para que fosse identificado o agente etiológico envolvido no surto. Dos surtos reportados (81 surtos), o que representou o número de hospitalizações maiores foram os surtos (2 surtos correspondentes a 144 casos humanos) que envolveram *Bacillus cereus* e *Bacillus* spp. com 74 casos de humanos hospitalizados. Os géneros alimentícios que estiveram envolvidos nestes surtos foram as bifanas (cujo número elevado de *Bacillus cereus* era de  $6,0 \times 10^4$  UFC/g), o peixe assado com puré e o frango estufado com arroz. Nestes dois últimos géneros alimentícios também foi enumerado *Bacillus* spp. (Correia et al., 2013).

A 16 de Abril de 2009, cooperantes da Direção de Avaliação e Comunicação dos Riscos, pertencente à Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, definiram alguns géneros alimentícios aos quais, nos últimos três anos, esteve associada, em Portugal, a presença de agentes biológicos patogénicos. Um dos géneros alimentícios, arroz de pato, apresentou diversos agentes patogénicos entre os quais o *Bacillus cereus* (Veiga et al., 2009).

Carvalho e equipa do Departamento de Tecnologia Alimentar, Biotecnologia e Nutrição Instituto Politécnico de Santarém, Escola Superior Agrária e Departamento de Controlo Alimentar do Laboratório de Medicina Veterinária realizaram uma pesquisa e contagem de *Bacillus cereus* em produtos de pastelaria com e sem creme. Como já foi referido anteriormente, o *Bacillus cereus* tem origem no solo e no pó, sendo um contaminante comum dos cereais, encontrando-se na extensão dos invólucros dos grãos. Como o *Bacillus cereus* é um microrganismo que produz esporos termorresistentes que o tornam particularmente adaptado aos alimentos tratados termicamente, como é o caso dos produtos de pastelaria, há uma grande possibilidade deste microrganismo aparecer neste tipo de produtos à base de cereais.

O estudo decorreu entre o mês de fevereiro e abril do ano de 2013 e envolveu 1070 amostras das quais 675 eram produtos de pastelaria sem creme e 395 produtos de pastelaria com creme. De acordo com os critérios microbiológicos estabelecidos pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) averiguou-se que mais de 95% destes produtos apresentaram níveis inferiores ao valor máximo de referência relativamente a *Bacillus cereus*. Os produtos que apresentaram níveis superiores, pertenciam, na sua maioria, ao grupo dos produtos de pastelaria com creme. Para tal resultado, Carvalho e equipa sublinharam a possibilidade desta contaminação por *Bacillus cereus* ser devido ao facto de o recheio ser adicionado depois da cozedura o que poderá dar origem a recontaminações. Em termos de segurança alimentar dos consumidores, os resultados foram ditos como satisfatórios (Carvalho et al., 2014).

### 2.3.2 Alimentos contaminados com *Bacillus cereus* - Casos a nível internacional:

Os agentes etiológicos geradores de doenças do foro alimentar diferem de continente para continente e de país para país, originando, deste modo, grandes diferenças de percentagens de surtos ou casos atribuídos a esse agente. As toxinfecções alimentares causadas por *Bacillus cereus* são relatadas e descritas desde o ano de 1955.

“Centers for Disease Control and Prevention” (CDC), em 1980, notificou nove casos de surtos causados por *Bacillus cereus*, envolvendo alimentos como a carne (bovina e de peru) e comidas mexicanas. Em 1981, oito surtos foram descritos pela CDC e os principais alimentos envolvidos foram o arroz, os crustáceos e os moluscos. Existem dados que a CDC tem de outros surtos que não estão registrados ou são mal diagnosticados devido à semelhança com os sintomas da intoxicação por *Staphylococcus aureus* e síndrome emética de *B. cereus*, e da intoxicação por *Clostridium perfringens* tipo A e síndrome diarreica de *B. cereus* (<http://www.cdc.gov/>).

Entre 1985 e 2000 surgiram surtos de toxinfecção alimentar nas Forças Armadas Alemãs tendo surgido o *Bacillus cereus* como responsável por 30% dos casos em humanos e 42% dos surtos declarados. Estes dados foram revelados por Ehling-Schulz e cooperantes após investigação na Alemanha (Ehling-Schulz et al., 2004).

A forma predominante de toxinfecção por *B. cereus* na Noruega, Finlândia, Bulgária e Hungria é a síndrome diarreica, enquanto no Reino Unido, Estados Unidos e Japão a forma predominante é a síndrome emética (Granum & Lund, 1997; Kotiranta et al., 2000; Ehling-Schulz et al., 2004). Este tipo de síndrome (emética) entre 1950 e 1985 prevaleceu no Japão e no Reino Unido (Kramer & Gilbert, 1989), além do mais, no Japão a forma emética está descrita como sendo dez vezes mais frequente do que a forma diarreica (Granum & Lund, 1997).

Kramer & Gilbert revelaram que, entre 1973 e 1985, o *Bacillus cereus* foi um dos agente etiológicos que provocou toxinfecções alimentares (Tabela 3.9) no Japão, Canadá, País de Gales, Inglaterra, Escócia, Holanda e também na Finlândia. Na Hungria, entre 1960 e 1968 o *Bacillus cereus* foi responsável por 15% das toxinfecções alimentares (Kramer & Gilbert, 1989).

O *Bacillus cereus* foi também o microrganismo mais implícito em surtos de toxinfecção alimentar, no ano de 1990, na Noruega. Em 1994, este microrganismo também foi um dos causadores de toxinfecções alimentares (Tabela 3.9) em Taiwan (Pan et al., 1996; Kotiranta et al., 2000).

Simone e colaboradores reportaram o *Bacillus cereus* como o maior responsável por grande número de episódios de toxinfecção alimentar na Holanda entre 1991 e 1994 (Simone et al., 1997).

Chapecó (município brasileiro do estado de Santa Catarina) entre o ano de 1995 e 2007 deteve 61 casos de surtos de toxinfecção alimentar em que 6 dos surtos (Tabela 2.9) eram por *Bacillus cereus* (Marchi et al., 2011).

Por cada ano (entre 2000 e 2008) 9,4 milhões de pessoas foram atingidas por vários agentes etiológicos, nos Estados Unidos. Desse número de pessoas, 3,4 milhões apresentaram toxinfecções bacterianas sendo 0,6% por *Bacillus cereus* (Tabela 2.9) (Scallan et al., 2011).

Do total de 63 surtos notificados em Mato Grosso do Sul (Brasil) no período de 1998-2001, trinta e nove (62%) foram confirmados (Tabela 2.9) e os microrganismos isolados mais frequentemente nesses surtos confirmados foram *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus*. O microrganismo *Bacillus cereus* foi indentificado em 4 dos 37 surtos (Câmara, 2002).

De acordo com o relatório redigido em 2006 pela EFSA (European Food Safety Authority) constatou-se que na União Europeia foram reportados 5710 surtos de toxinfecção alimentar (mais 399 que no ano de 2005) de entre os quais 13 ocorreram em Portugal (mais dez que no ano de 2005). Os microrganismos do género *Bacillus* ocuparam o oitavo lugar com 78 surtos. A toxinfecção provocada por toxinas é a quinta causa mais frequente. As toxinas de *Bacillus cereus* foram responsáveis por 77 surtos (941 casos humanos), correspondendo a 17,1% dos casos (Tabela 2.9). Dos 941 casos humanos, 34 foram hospitalizados e não foi registado nenhuma morte. Os principais alimentos envolvidos corresponderam à carne, a produtos cárneos e cereais (incluindo arroz), no entanto em 33 surtos, a fonte não foi especificada e em 18,2% dos surtos a fonte era desconhecida. Estes surtos ocorreram principalmente em restaurantes (57,1%), tendo o maior surto ocorrido na Bélgica (envolveu 70 pessoas) através de leite contaminado com *B. cereus* (EFSA, 2007).

No ano de 2010 foi notado 26 surtos compreendendo 561 casos humanos, causado por toxinas de *Bacillus* evidenciados na União Europeia. Apenas três (0,5%) destes casos humanos foram hospitalizados, na Hungria. Tanto o número de surtos como o número de casos foi menor em 2010 do que em 2009 (59 surtos, 929 casos). Não houve mortes registradas causadas por toxinas de *Bacillus* em 2010 (EFSA, 2012).

**Tabela 2.8:** Surtos confirmados por vários agentes etiológicos incluindo *Bacillus cereus* entre 1960 e 2008.

<b>Data</b>	<b>País/Continente</b>	<b>x % Percentagem de incidência do <i>B. Cereus</i>*</b>	<b>Autores</b>
<b>1960-1968</b>	Hungria	15%	
<b>1973-1985</b>	Finlândia	17,8%	Kramer & Gilbert, 1989
	Holanda	11,5%	
	Escócia	0,8%	
	Inglaterra	0,7%	
	País de gales	0,7%	
	Canadá	2,2%	
	Japão	0,7%	
<b>1994</b>	Taiwan	14,9%	Pan et al., 1996 Kotiranta et al., 2000
<b>1995-2007</b>	Brasil (Município de Chapecó)	9,7%	Machie et al., 2011
<b>2000-2001</b>	Brasil (Estado Mato Grosso do sul)	10,3%	Câmara, 2002
<b>2000-2008</b>	Estados Unidos	0,6%	Scallan et al., 2011
<b>2006</b>	Europa	1,3%	EFSA, 2007

\*Percentagem -Número total de toxinfecções alimentares x% em que foi devido a *Bacillus cereus*.



### 2.3.3 Alimentação infantil e o *Bacillus cereus*:

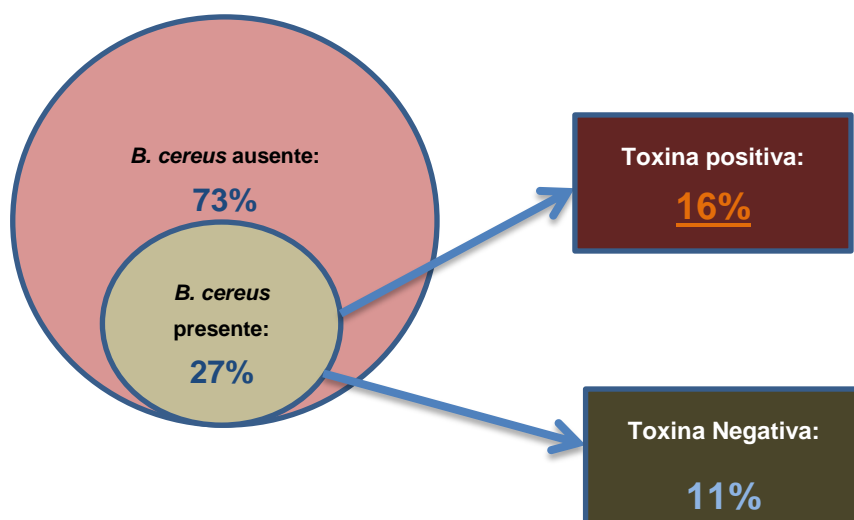
A alimentação determina o estado de saúde de populações no geral e indivíduos de diversas faixas etárias em particular as crianças, traduzindo assim as suas condições de vida, o contexto em que se inserem e a cultura que partilham (Loureiro, 2004). A importância da alimentação e o estado da nutrição no crescimento e desenvolvimento da criança contribuem para a sua saúde, sendo a avaliação da qualidade microbiológica extremamente elementar para garantir a segurança alimentar deste tipo de alimentos (WHO-World Health Organization, 2007).

Nos primeiros anos de vida a alimentação tem um grande peso, pois as crianças estão mais sujeitas a carências e desequilíbrios nutricionais e as experiências de vinculação e a educação que se recebe são determinantes na adoção de atitudes e comportamentos relacionados com a saúde. Assim, uma alimentação saudável é essencial para assegurar um adequado crescimento e desenvolvimento das crianças (Nunes & Breda, 2001).

Para assegurar a saúde dos lactentes e das crianças jovens, a regulamentação comunitária (Regulamento (CE) nº 1831/2003 da Comissão de 22 de dezembro de 2003 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios e o Regulamento (CE) nº 1831/2003 da Comissão de 22 de dezembro de 2003 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis as géneros alimentícios) introduziu valores limites específicos para os contaminantes nos alimentos dirigidos à alimentação infantil sendo necessário otimizar e validar os métodos analíticos para baixos teores de contaminantes.

Furtado e equipa pertencente ao Departamento de Alimentação e Nutrição do INSA, redigiram um artigo, em 2013, acerca dos contaminantes de origem microbiológica em alimentação infantil. Para tal investigação analisaram-se 62 amostras de fórmulas desidratadas infantis (leites e papas) colhidas em hipermercados e lojas de produtos biológicos, na cidade de Lisboa. Os ensaios microbiológicos efetuados nas amostras acima detalhadas incidiram nas contagens de diversos microrganismos de entre os quais se destaca o *Bacillus cereus*. Nas amostras com níveis de qualidade aceitáveis, foram detetadas estirpes de *Bacillus cereus* em 27% de amostras analisadas (Figura 2.4).

No entanto, como o *Bacillus cereus* é uma bactéria potencialmente patogénica, efetuou-se a pesquisa de toxina diarreica das estirpes isoladas, verificando-se que 16% eram produtoras desta toxina (Furtado et al., 2013).



**Figura 2.4:** Resultado do estudo da análise microbiológica das 62 amostras de fórmulas desidratadas infantis. Círculo rosa claro represente 73 % da totalidade das amostras foram negativas, Círculo castanho claro indica a presença de *Bacillus cereus* em 27% de amostras analisadas; Percentagem da toxina produzida sublinhado a cor de laranja. Adaptado de Furtado et al., 2013.

Os microrganismos que fazem parte da flora típica dos leites em pó são os micrococcos, estreptococos e microrganismos aeróbios formadores de esporos, como o *Bacillus cereus*. Os microrganismos que habitualmente estão envolvidos em traços de doença cujo portador é o leite em pó são a *Salmonella*, a *Listeria monocytogenes*, o *Staphylococcus aureus*, o *Bacillus cereus* e o *Enterobacter sakazakii* (ICMSF, 2002). Com efeito, as fórmulas infantis em pó são frequentemente avaliadas para a presença dos agentes etiológicos anteriormente referidos (Forsythe, 2005).

O controlo do *B. cereus* na indústria de produtos lácteos pode envolver algumas complicações dada a sua capacidade de esporulação e por ser um contaminante potencial do leite e do ambiente. Dado que os esporos do *B. cereus* são hidrofóbicos, favorece a formação de biofilmes nas superfícies de contacto com alimentos, sendo a sua remoção difícil através dos procedimentos habituais de higienização tal como a pasteurização, pois não é suficiente na eliminação deste agente patogénico uma vez que os esporos são termorresistentes (Hilliard et al., 2003).

O CDC em 1994 reportou um caso de surto que ocorreu em crianças e funcionários de creches após um almoço servido. Em 21 de julho de 1993, Virgínia (um dos 50 estados dos Estados Unidos, localizado na região sudeste do país), sofreu um surto, causado por uma doença gastrointestinal aguda. O *Bacillus cereus* foi o agente etiológico causador de doenças transmitidas por alimentos, responsáveis por 2% dos surtos notificados ao CDC durante 1973-1987. O episódio de toxinfecção alimentar ocorreu numa creche onde estavam 82 crianças (idade  $\leq 6$  anos) e 9 funcionários e após investigações feitas constatou-se que das 91 pessoas presentes na creche, 67 tinham consumido a refeição fornecida durante almoço. Das 67

peessoas que consumiram a refeição, somente 14 (21%) desenvolveram sintomas tais como náusea (71%), dores abdominais (36%) e diarreia (14%). Doze dos catorze casos ocorreram em crianças entre os 2,5 anos e os 5 anos. Os outros dois casos ocorreram em funcionários. O único prato associado à doença foi o de frango e arroz frito cuja preparação foi executada num estabelecimento perto da creche na noite anterior à refeição e foi arrefecido a temperatura ambiente antes de refrigeração. Na manhã do almoço, o arroz foi frito em óleo com pedaços de frango cozido e foi imediatamente entregue na creche sem refrigeração prévia e foi servido sem reaquecimento (CDC, 1994).

Depois de executadas análises microbiológicas à refeição e ao vômito de uma das crianças afetadas, o *Bacillus cereus* foi detetado e isolado. Enumeraram mais de  $10^6$  UFC/g de alimento no frango com arroz frito e mais de  $10^5$  UFC/g no vômito da criança. Após o surto, a autoridade de saúde do distrito recomendou a toda a equipa do restaurante que o arrefecimento à temperatura ambiente de arroz ou outro qualquer alimento deveria ser interrompida e a comida deveria ser mantida a temperaturas adequadas (ou seja, abaixo dos 5 °C ou acima de 60 °C para tal recomendaram também o uso de termómetro para verificar a temperatura dos alimentos (CDC, 1994).

A organização mundial da saúde lançou uma diretriz sobre a preparação, segurança, armazenamento e manipulação das fórmulas desidratadas infantis e mencionou que o uso de água muito quente, para a reconstituição das fórmulas desidratadas infantis, tem sido questionado devido à perda de nutrientes sensíveis ao calor, ao risco de queimaduras para lactentes e para o preparador e também ao risco de ativação de *Bacillus cereus* ou outras bacterias esporuladas (FAO / WHO, 2006). Os resultados dos estudos relatados (*Standard Food Australia New Zealand*, 2003) indicam que o nível de *Bacillus cereus* na fórmula não é afetado nem pela temperatura da água usada (56°C ou 90°C) nem pelo posterior arrefecimento (WHO, 2007).

Becker e colaboradores revelaram que os alimentos para crianças incluindo os produtos de leite em pó são conhecidos por serem frequentemente contaminados com *Bacillus cereus*. A fonte do organismo e o seu comportamento, no produto e no equipamento, durante o processamento, é amplamente discutido pelos autores. No que diz respeito à incidência de *B. cereus* em alimentos para criança Becker e equipa ilustraram que 261 amostras de alimentos para crianças foram distribuídos em 17 países, posteriormente foram colhidos e analisados para a deteção e enumeração de *B. cereus*. Os resultados foram os seguintes:

- 54% do total de amostras estavam contaminadas com 0,3-600 níveis de *Bacillus cereus* /g de alimento;
- 10% do total de amostras revelaram contagens > 10 níveis de *Bacillus cereus*/g de alimento;
- 44% do total de amostras positivas continham entre 0,3 a 10 níveis de *Bacillus cereus*/g de alimento;

- 1,5% do total de amostras estavam contaminadas com mais de 100 níveis de *Bacillus cereus*/g de alimento atingindo o valor máximo de 600 níveis de *Bacillus cereus*/g de alimento.
- 50% dos alimentos contaminados eram fórmulas para lactentes com base em leite.

Comparados estes resultados a estudos anteriores, de 1982/83, a percentagem de amostras contaminadas provenientes da Alemanha aumentou de 31% para 70% (no caso de fórmulas infantis), de 28% para 55% (no caso de fórmulas de transição), e de 40% para 100% (no caso de alimentos dietéticos especiais). Deve salientar-se, no entanto, que o número de *B. cereus* foi quase o mesmo em ambos os estudos com a contagem mais alta em 1982/83 de 460 UFC/g e, em 1992, de 600 UFC/g. Sublinha-se o facto de a bactéria estar presente num baixo nível de incidência, o que não constitui um perigo potencial aquando da ingestão destes alimentos. Os principais fatores de risco associados à ocorrência de surtos são o manuseamento e preparação antecipada e a manutenção das temperaturas incorretas que são favoráveis ao crescimento e desenvolvimento deste microrganismo até níveis que permitam a produção de toxinas.

A conclusão desta investigação feita por Becker e colaboradores visou a revelação da boa qualidade microbiológica dos alimentos analisados, sendo o consumo dos mesmos estritamente seguro caso se respeite as recomendações de preparação e manipulação bem como o tempo que decorre entre a preparação e o consumo (Becker et al., 1994).

#### **2.3.4 *Bacillus cereus* no arroz e produtos à base de cereais:**

O arroz é um cereal que faz parte da dieta habitual dos habitantes de todo o mundo e é também o alimento que tem sido mais envolvido em toxinfecções alimentares associadas ao *Bacillus cereus* (Harmon et al., 1992; Che et al., 2001). Este microrganismo é reconhecido como um agente etiológico de doenças de origem alimentar há mais de 40 anos (Adams & Moss, 2000).

Um surto associado a este microrganismo é caracterizado por náuseas e vômitos entre a primeira e a quinta hora após a ingestão de arroz cozinhado, segundo o publicado pelo *Public Health Laboratory Service* (Reino Unido) em 1972 ([www.asae.pt](http://www.asae.pt)).

A forma de confeccionar o arroz, quando este se destina ao consumo humano, pode promover o crescimento de *B. cereus*. As formas de contrair uma toxinfecção alimentar mediada por esse microrganismo incluem o consumo de arroz pré-cozidos e armazenados de forma incorreta (Baat, 1999; Little et al., 2002).

Kramer & Gilbert fundamentaram que as toxinfecções ligadas ao *Bacillus cereus*, nomeadamente a síndrome emética causada pela toxina cereulida, eram frequentemente associadas ao arroz e a massas. O caso particular do arroz cozido e a sua manutenção a temperatura ambiente, sem refrigeração durante várias horas (antes de fritar ou reaquecer) levou a vários surtos de toxinfecção por via emética, pois a toxina cereulida é produzida durante o armazenamento do arroz cozido e não é destruída pela fritura ou reaquecimento (Kramer & Gilbert, 1989).

A frequência de isolamento de *B. cereus* no arroz é de 40% a 100% (Franco & Landgraf, 1996) no entanto, este microrganismo tem um reservatório natural (o solo) e, devido à resistência dos seus esporos, o *B. cereus* pode ser isolado em qualquer tipo de ambiente, estando amplamente distribuído em toda a natureza (Ghelardi et al., 2002). Por esta razão este microrganismo contamina o arroz ainda na plantação, onde permanece em forma de esporos, resistindo assim a qualquer tipo de tratamento térmico usado na confeção do arroz. Consequentemente, no momento em que o arroz é cozido, o esporo germina e torna-se uma célula viável libertando as toxinas causando assim uma toxinfecção alimentar.

O tempo que normalmente é necessário para se ferver uma solução no âmbito da culinária não é suficiente para destruir os esporos de *Bacillus cereus* pois este microrganismo é resistente ao calor (elevadas temperaturas). Contudo só excedendo o tempo de fervura, necessário para atingir o estado do preparado culinário aceitável, é que os esporos do microrganismo são eliminados (Houška et al., 2007).

Azanza & Centeno, em 2004, descobriram na literatura que a concentração máxima inicial de esporos no arroz era de  $10^5$ /g de alimento e o tempo total de inativação pelo calor era de 25 minutos a 100°C. O facto de se ultrapassar o tempo e temperatura correta e adequada torna o arroz demasiado cozido. Por esta razão os esporos, que estavam no arroz cru sobreviveram ao tratamento exercido (aquecimento habitual a altas temperaturas, 25 minutos a 100°C) pois conseguem sob algumas condições sobreviver e germinar no arroz cru em formas vegetativas e subsequentemente multiplicar-se (Houška et al., 2007).

A germinação dos esporos (no arroz cozinhado) requer uma temperatura na ordem dos 5°C aos 50°C. A temperatura para o crescimento das formas vegetativas é de 15°C a 50°C com o crescimento ótimo entre os 30°C a 50°C (Lake et al., 2004).

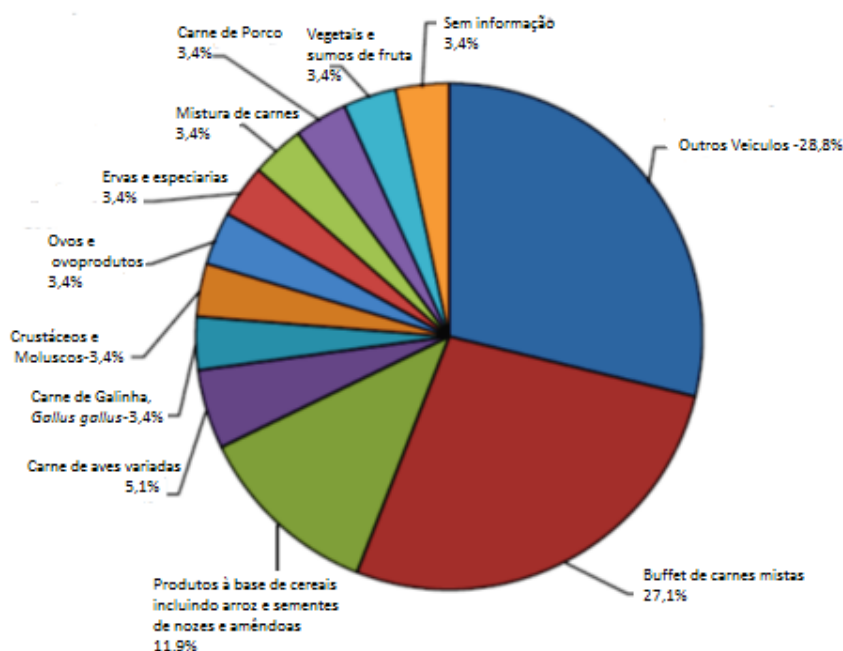
No Japão foi realizado um estudo por Ueda e equipa, em que se verificou que 55% das bactérias, presentes no ar e em plantações de arroz, foram identificadas como *B. cereus* (Ueda et al., 1992). Este estudo evidenciou a prevalência deste microrganismo no ambiente e por este motivo ocorrem mais facilmente contaminações deste agente etiológico em alimentos como cereais, condimentos, carne, laticínios, pratos à base de vegetais e arroz cozido (Harmon, 1992).

Ueda e colaboradores também realizaram uma investigação na Irlanda nomeadamente ao arroz servido em hotéis, restaurantes, hospitais e tendas de comida local. Constataram que

6% das amostras analisadas apresentaram resultados insatisfatórios quanto à presença do *B. cereus*. As amostras positivas apresentaram valores entre  $10^4$  e  $10^5$  UFC de *B. cereus* por grama de alimento analisado (Ueda et al., 1992).

No verão do ano de 2000, ocorreu um surto de toxinfecção por *B. cereus* na Holanda. Após 2 horas do consumo de um prato de arroz vegetariano, cerca de 100 estudantes de um grupo de aproximadamente 1200, apresentaram crises de vômitos e dor abdominal. Nas amostras analisadas do alimento em causa (arroz vegetariano) foi detetada a toxina emética em concentrações de 0,03-13,3 µg equivalentes de valinomicina por grama de alimento. *The EFSA Journal* revelou que das experiências realizadas, *in vitro*, em laboratório, foi testado o número de células necessárias para o alimento ficar contaminado e conclui-se que eram necessárias  $10^5$ - $10^8$  células da toxina emética para o alimento ficar contaminado por *B. cereus*. Isto permite constatar que a toxina emética foi detetada no laboratório apenas no final da fase de crescimento de *B. cereus* (EFSA,2005).

Diferentes géneros alimentares foram relatados pela EFSA em 2009 sendo indicativo da causa de vários surtos verificados na Europa causados por toxinas de *Bacillus*. As refeições variadas dispostas em Buffet quente foram os mais identificados e associados a 27,1% dos surtos verificados seguidos por produtos de cereais em 11,9% dos surtos (Figura 2.5) (EFSA,2009).



**Figura 2.5:** Distribuição de veículos de alimentos em surtos verificados na EU causado pelas toxinas de *Bacillus* na UE em 2009. Seta preta realça a incidência na matriz arroz e cereais com 11,9%. Adaptado de EFSA,2009.

Na tabela 2.10 estão apresentados alguns exemplos de alimentos (arroz e produtos à base de cereais) ligados à toxinfecção por *B. cereus*. Os dados foram adaptados do “*The EFSA Journal* (2005), *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. in foodstuffs”.

**Tabela 2.9:** *Bacillus cereus* e outros *Bacillus* spp. em alimentos". Adaptado de EFSA, 2005.

<b>Tipo de alimento</b>	<b>Número de pessoas afetadas</b>	<b>Sintomas</b>	<b>UFC de <i>B. cereus</i> por grama de alimento</b>	<b>Referencias</b>
<b>Refeição de Frango com arroz</b>	300	Diarreia	$10^6$	Ripabelli et al., 2000
<b>Arroz frito</b>	4	Vômitos	$>10^6$	Grein, 2001
<b>Arroz cozido e frito</b>	14	Vômitos e diarreia	$>10^6$	Khodr et al., 1994
<b>Refeição de restaurante com arroz cozido</b>	5	Vômitos	$6 \times 10^3$	Ripabelli et al., 2000
<b>Pratos de arroz, espagete e outras massas (surto 1974-1999 no Japão)</b>	14	Vômitos	Não determinado	Agata et al., 2002
<b>Quiche</b>	79	Diarreia e vômitos	$>100$	Penman et al., 1996
<b>Bolos associados a dois banquetes</b>	95 78	Diarreia	$>10^2$	Ghelardi et al., 2002
<b>Esparguete com <i>Pesto</i></b>	2	Diarreia e vômitos	Não determinado	Mahler et al., 1997
<b>Massa chinesa</b>	50	Vômitos e diarreia	$6 \times 10^7$	Takabe & Oya, 1976
<b>Prato de massa convencional em cozinha domestica</b>	2	Vômitos	$7 \times 10^6$	Jääskeläinen et al., 2003

## 2.4 Tratamento e Prevenção da contaminação:

O *B. cereus* pode ser isolado de alimentos e pode sobreviver a um armazenamento prolongado em produtos alimentícios secos. A inativação de bactérias competitivas e a subsequente ativação dos esporos por aumento de temperatura faz com que grandes quantidades de alimentos cozinhados e armazenados entre 4°C e 60°C permitam a multiplicação da bactéria e eventual produção da toxina.

A maioria das intoxicações resulta da germinação dos esporos e posterior multiplicação das células durante o armazenamento a temperaturas inadequadas de pratos cozinhados, isto porque as formas vegetativas de *B. cereus* são inativadas durante a cozedura dos alimentos.

O controlo contra a intoxicação alimentar tem o princípio de impedir a germinação de esporos e minimizar o crescimento de células vegetativas (Schraft & Griffiths, 2006). Para conseguir isso, os alimentos devem ser rapidamente arrefecidos para temperaturas de 4°C ou mantidos acima de 60°C, e cuidadosamente reaquecidos antes de servir. Como os esporos de *B. cereus* estão muito disseminados na natureza e sobrevivem facilmente à cozedura, a prevenção das intoxicações alimentares por *B. cereus* deve ter por base o cumprimento dos seguintes requisitos:

- Aquecimento dos alimentos a temperaturas suficientes para que sejam destruídas as formas vegetativas;
- Manutenção dos alimentos a temperaturas superiores a 65°C depois de preparados e até que sejam servidos;
- Promoção do arrefecimento rápido dos alimentos que vão ser armazenados a temperaturas de refrigeração, para que não ocorra germinação de esporos.
- Arrefecimento rápido das sobras a temperatura: <5°C;
- Aquecimento dos alimentos antes de servir a temperatura: >55°C (Lacasse, 1995; [www.asae.pt](http://www.asae.pt)).

A ocorrência de microrganismos patogénicos nos alimentos pode ser determinada a partir de fatores/limites (Tabela 2.11) que determinam a sua sobrevivência e crescimento (Forsythe, 2002). Por este facto, esses fatores e limites deverão ser respeitados de forma a evitar o crescimento do microrganismo. Entre estes fatores incluem-se:

- Fatores intrínsecos aos alimentos, tais como a atividade da água ( $A_w$ ), o pH, o potencial de oxidação-redução, a composição química e a presença de substâncias anti-microbianas naturais;
- Fatores extrínsecos aos alimentos, tais como a temperatura, a humidade relativa e a composição a atmosfera em contacto com o produto;
- Fatores implícitos no processo de fabrico (Forsythe, 2002).



**Tabela 2.10:** Fatores/limites de crescimento do *Bacillus cereus*. Adaptado de Forsythe, 2002.

Limites de Crescimento	Valores Limite
Temperatura mínima (°C)	5
Temperatura máxima (°C)	55
pH mínimo	4,9
pH máximo	8,8
Aw mínimo	0,93
NaCl máximo (%)	10

Dado que o *Bacillus cereus* tem uma distribuição ubiquitária, devem-se evitar as contaminações cruzadas entre alimentos crus e cozinhados e lavar muito bem frutas e hortícolas com água antes da sua utilização. A higiene pessoal cuidada e o cumprimento das boas práticas são requisitos fundamentais para prevenir a contaminação de alimentos (<http://www.asae.pt/>).

A maioria das doenças é de curta duração e autolimitante, e a antibioterapia não é indicada. Em pacientes imunocomprometidos, a bacteriemia e outras infeções por *Bacillus cereus* deverá ser tratada rapidamente com Gentamicina, Vancomicina, Ciprofloxacina ou Clindamicina. Assim como acontece com outras infeções alimentares, a higiene é fundamental na preparação dos alimentos. Os alimentos cozidos devem de ser armazenados em refrigeração e completamente reaquecidos antes do consumo (Mims et al., 2005).

## **2.5 Métodos de deteção das toxinas de *Bacillus cereus*:**

As técnicas tradicionais de microbiologia de alimentos fundamentam-se na utilização de testes morfológicos e bioquímicos para a caracterização da fenotipagem, subtipagem e identificação de géneros, espécies e subespécies microbianas. No entanto, estes resultados podem apresentar uma grande variabilidade de resultados, devido a fatores ambientais sobre a expressão genética, além de outras desvantagens, como o baixo poder discriminatório em microrganismos com pouca variabilidade genética, além do risco de interpretações de caráter erróneo quando se utiliza um número limitado de testes (Settanni & Corsetti, 2007; Gandra et al., 2008).

Diversos métodos, para a amplificação “*in vitro*” de ácidos nucleicos, têm sido desenvolvidos. Entre eles, a reação em cadeia da polimerase (PCR que é utilizada para a

identificação de estirpes bacterianas isoladas, para detetar bactérias em alimentos, em conjunto com as etapas de enriquecimento de culturas e para a deteção direta de bactérias e vírus em amostras de alimentos (Candrian, 1995).

A PCR apresenta vantagens em relação aos métodos convencionais, tais como: maior poder discriminação, maior rapidez, bom limite de deteção, maior seletividade, especificidade, e a possibilidade de trabalhar com bactérias que não são cultiváveis nos meios de cultura convencionais (Gandra et al., 2008). No entanto, apresenta algumas desvantagens, entre elas, não diferenciar células vivas e mortas, sofrer interferência com a presença de inibidores da enzima polimerase em alguns alimentos e a falta de aprovação, padronização e regulamentação por parte dos órgãos oficiais (Malorny et al., 2003).

Uma das etapas decisivas dos métodos moleculares é o isolamento do ADN bacteriano em quantidade e qualidade suficientes para amplificação pela PCR (Candrian, 1995; Postollec et al., 2011). Outra técnica molecular de interesse para o diagnóstico de agentes patogénicos em alimentos é a multiplex PCR (mPCR). A mPCR amplifica simultaneamente diferentes sequências de ADN, a partir de múltiplos pares de primers com diferentes especificidades. A separação por eletroforese de fragmentos com diferentes pesos moleculares origina diversas bandas que são visualizadas em gel de agarose (Settanni & Corsetti, 2007).

Devido ao facto das enterotoxinas possuírem um elevado potencial antigénico, existem testes comerciais para deteção imunológica das toxinas HBL e NHE, um método relativamente rápido e de simples execução. Um dos testes existentes é o BCET-RPLA® (Oxoid Ltd). Este teste comercial é um método semi-quantitativo que deteta, através de aglutinação reversa o componente L2 da enterotoxina HBL, quer diretamente a partir dos alimentos, quer a partir de culturas de *B. cereus*. No entanto, a positividade do teste não é indicador da produção da enterotoxina, uma vez que não deteta nem o componente L1 nem o componente B, também necessários para que seja possível a ação da enterotoxina.

Existe um segundo teste comercial que permite a deteção da componente nheA da enterotoxina não hemolítica: o TECRA-BDE® (*Tecra International Pty Ltd*). Este teste compõe o método de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) e pode ser utilizado quer para amostras alimentares quer para amostras ambientais. Este teste também tem a desvantagem de não confirmar a presença da toxina biologicamente ativa, uma vez que só se deteta um dos componentes da toxina tripartida (Arnesen et al., 2008).

O teste em animais de laboratório também pode ser utilizado para a deteção não específica das enterotoxinas de *B. cereus*. Uma das possibilidades é o da reação de permeabilidade vascular (VP) na pele de coelho. Caso o teste seja positivo visualiza-se uma área central de necrose localizada numa zona de edema (Beecher & Wong, 1994).

Os testes ELISA e RPLA (*reversed passive latex agglutination*) estão disponíveis comercialmente para a toxina diarreica de *Bacillus cereus*, têm um limite de sensibilidade de 1 ng toxina /mL de material e levam aproximadamente quatro horas para obter o resultado.

Contudo nenhum teste foi desenvolvido para a toxina emética devido a problemas de purificação (Forsythe, 2002).

Considerando que a toxina HBL produz um retrato característico de hemólise, pode ser executada a pesquisa de hemólise em eritrócitos de ovelha (Figura 2.6). A utilização de culturas de células na detecção de enterotoxinas de *B. cereus* é outra metodologia que pode ser aplicada. No entanto, todas as enterotoxinas possuem atividade citotóxica não permitindo, desta forma, a diferenciação de cada uma das toxinas. Pode-se recorrer à pesquisa de citotoxicidade em culturas de células vero, células Caco-2 (Wijnands et al., 2005), células CHO (*Chinese hamster ovary*) e células McCoy (Arnesen et al., 2008).



**Figura 2.6:** Gelose de sangue de ovelha semeado com *Bacillus cereus* apresentando  $\beta$ -hemólise ilustrado pela seta preta. Adaptado de Fundação Oswaldo Cruz, 2014.

Em síntese, não existe qualquer teste que nos permita ao mesmo tempo demonstrar qual a toxina presente numa determinada estirpe e se essa mesma estirpe é realmente tóxica. Apenas é possível determinar se uma dada estirpe é ou não potencialmente patogénica.

## 2.6 O Arroz:

Tradicionalmente, o arroz, tem sido utilizado para o consumo humano sendo o arroz branco e o arroz parboilizado o mais consumido. O arroz branco fornece 536 kcal/capita/dia. O arroz parboilizado sofre o processo de parboilização, ou seja, um pré-cozimento, em que os nutrientes do pericarpo são parcialmente passados para a cariopse do grão. Os Produtos de arroz e outros produtos à base de cereais que se destinam a mercados mais rigorosos devem obedecer a normas de controlo de qualidade e a vários critérios de avaliação entre estes estão as características microbiológicas, as quais permitem avaliar o produto quanto às condições de

processamento, armazenamento e distribuição, e também avaliar a vida útil do produto e o risco para saúde do consumidor (Franco & Landgraf, 1996).

Sendo uma cultura extremamente versátil, que se adapta a diferentes condições de solo e clima, é considerada a espécie que apresenta maior potencial para o combate à fome no mundo por motivos económicos e sociais (Alonço et al., 2005). Este alimento básico predomina a nutrição da população em dezassete países da Ásia e do Pacífico, nove países da América do Norte e do Sul e oito países da África (FAO, 2004).

O arroz tem uma elevada diversidade genética e consequentemente milhares de variedades de arroz são cultivados em todo o mundo. No estado natural, o arroz não polido apresenta-se em diversas cores tais como o castanho, vermelho, roxo e até mesmo preto. Estas variedades de arroz coloridos são frequentemente valorizadas pelas suas propriedades no campo de saúde humana. Arroz não moído tem um maior teor de nutrientes do que o arroz branco ou polido (Tabela 2.12) (FAO, 2004).

**Tabela 2.11:** Os teores de nutrientes de variedades de arroz. Adaptado de FAO, 2004.

<b>Tipo de arroz</b>	<b>Proteína (g/100g)</b>	<b>Ferro (mg/100g)</b>	<b>Zinco (mg/100g)</b>	<b>Fibra (g/100g)</b>
<b>Branco</b>	6,8	1,2	0,5	0,6
<b>Castanho</b>	7,9	2,2	0,5	2,8
<b>Vermelho</b>	7,0	5,5	3,3	2,0
<b>Roxo</b>	8,3	3,9	2,2	1,4
<b>Preto</b>	8,5	3,5	-	4,9

Devido à tradição e à preferência, o arroz normalmente é moído produzindo-se assim o tradicional arroz branco. Embora este processo reduza o tempo de cozedura e aumente o tempo de prateleira e de armazenamento, também remove uma grande percentagem de muitos nutrientes, incluindo proteínas, fibras, gordura, vitaminas do complexo B e ferro. Diversas técnicas de fortificação podem ser utilizadas para adicionar as vitaminas e minerais essenciais para o grão de arroz. Infelizmente, esta prática não é comum em muitos países produtores de arroz que consomem o arroz devido à limitada infra-estrutura para o processamento, controle regulatório e comercialização de alimentos enriquecidos (FAO, 2004).

As contaminações microbiológicas, nos produtos à base de cereais incluindo o arroz, podem ocorrer em todas as etapas pelas quais passam os produtos agrícolas, colheita,

transporte, armazenamento, processamento e acondicionamento) e também podem ocorrer nos diversos meios pelo qual os produtos estão inseridos, no solo, na água ou no ar, incluindo os diversos contatos físicos, mecânicos ou manuais. No entanto, o desenvolvimento microbiano depende do tipo de substrato que constitui o alimento, ou seja, depende das condições de desenvolvimento biológico que o produto oferece, tais como o armazenamento, a disponibilidade de água necessária aos processos metabólicos ou seja a quantidade de água livre disponível no alimento (Ferreira et al., 2004).

Existem diversos fatores que podem reduzir significativamente o rendimento da cultura de arroz entre estes destacam-se as enfermidades mais comuns (fusariose, helmintosporiose e piriculariose) associadas ao arroz que podem conduzir a uma redução no rendimento na faixa de 20 a 50% (Balardin & Borin, 2001).

Em 1995, a Comissão do *Codex Alimentarius* acordou na inquisição de critérios de segurança e qualidade para o arroz produzido para consumo humano e também estabeleceram limites máximos de resíduos de pesticidas, micotoxinas e determinados metais pesados como cádmio. Estas normas para o arroz foram aceites pela Organização Mundial do Comércio (OMC), para que a Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) tomem como certo a garantia de toda manipulação do arroz com base científica sólida.

O Comité Misto FAO / OMS e Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) reuniram e sublinharam todas as questões que influenciam a segurança e a qualidade do arroz tendo que o seu objetivo final visa o aconselhamento a países membros sobre as boas práticas agrícolas e de fabricação para o cultivo e transformação de arroz.

### **2.6.1 Produção e consumo de Arroz e outros cereais em Portugal**

Em Portugal parte da cultura alimentar é guiada pelo arroz e cuja longa tradição foi herdada inicialmente dos árabes. A produção de arroz em Portugal ocupa cinco rios: Mira, Sado, Sorraia, Tejo e Mondego. Segundo dados revelados pela Associação nacional dos Industriais de Arroz (ANIA), a produção de arroz em Portugal ronda em média as 90 mil toneladas de arroz (em equivalente branqueado) por ano (<http://www.ania.pt/>).

As empresas e os agricultores começam a inserir-se num contexto de menor proteção económica, resultantes dos diversos acordos comerciais que a União Europeia realizou com outros blocos económicos. Esta abertura comercial tem produzido forte concorrência de produtos importados, que tem favorecido a mudança de consumo do arroz subespécie Japónica (tipo carolino) produzido em Portugal para o arroz subespécie Indica (tipo agulha) importado, e paralelamente no aumento da procura por tipos exóticos de arroz (*basmati*, selvagem, *thai*, entre outros) e ainda por refeições pré-preparadas (Dias & Rocha, 2012).

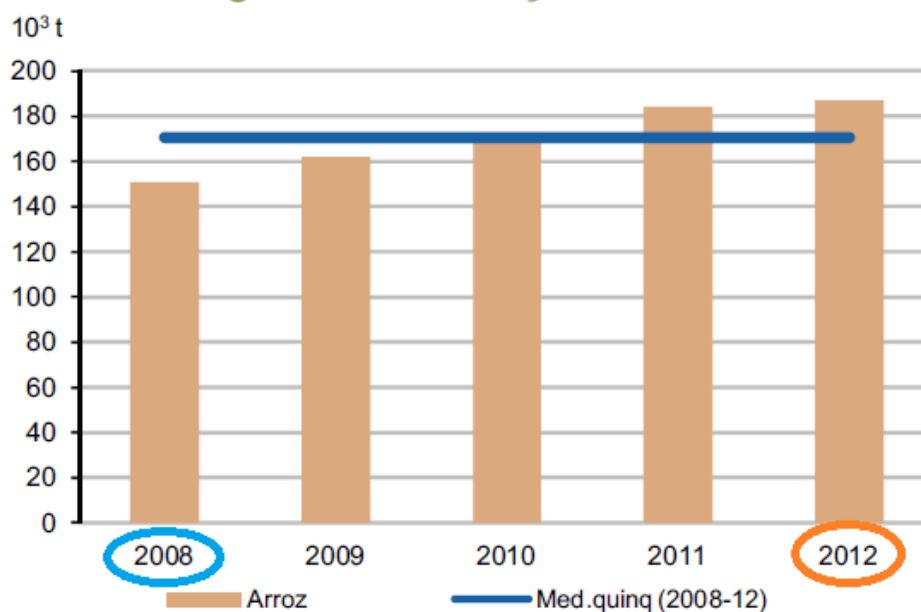
A produção de arroz em Portugal tende a aumentar (2002 foi produzido 145905 t de arroz - 2012 foi produzido 184100 t de arroz) pois segundo dados da FAOSTAT, desde 2002 até 2012 (Tabela 2.13) só se observou um declínio da produção do arroz cujo ano envolvente foi o de 2005 (121495 t). A produção de arroz cobre apenas metade da sua procura pois de acordo com os dados do EUROSTAT em Portugal consome-se cerca de 17,5 kg de arroz *per capita* por ano. O restante é importado de outros países da EU e do resto do mundo.

**Tabela 2.12:** Valores aproximados em toneladas (t) da produção de arroz em Portugal desde 2002 até 2012; Fonte: <http://faostat.fao.org/>

Ano	Produção (t)
2002	145905
2003	147802
2004	149255
2005	121495
2006	147200
2007	156200
2008	150700
2009	161800
2010	170200
2011	182450
2012	184100

Segundo as estatísticas agrícolas executadas no ano de 2012 pelo Instituto Nacional de Estatística (INE) ao arroz, cultura totalmente dependente das disponibilidades hídricas, não se registaram constrangimentos significativos na capacidade de fornecimento de água às searas (exceção feita a alguns casos na península de Setúbal). O INE denotou que o ano decorreu com normalidade, tendo o tempo seco e o cumprimento dos tratamentos fitossanitários recomendados contribuído para a reduzida expressão dos ataques da principal

doença do arroz (piriculariose). A produção rondou as 187 mil toneladas (Figura 2.7), valor superior ao alcançado em 2011 (+1,6%). Em 2011, Portugal manteve-se autossuficiente em leite e vinho e vem caminhando para a autossuficiência em arroz branqueado, tendo atingido um grau de autossuficiência de 97% em 2011 (INE, 2013).



**Figura 2.7:** Produção de arroz em Portugal desde o ano 2008 (círculo azul) até 2012 (círculo laranja). Adaptado de INE (2013).

No geral, no caso de muitos cereais constata-se uma tendência para a redução da produção, à exceção do milho e do arroz, cuja evolução foi positiva. No caso do milho o aumento da superfície cultivada e da produção tem sido pouco valorizado pela indústria alimentar (Tabela 2.14)

**Tabela 2.13:** Produção de cereais em Portugal desde 2010 a 2012. Adaptado de INE (2013).

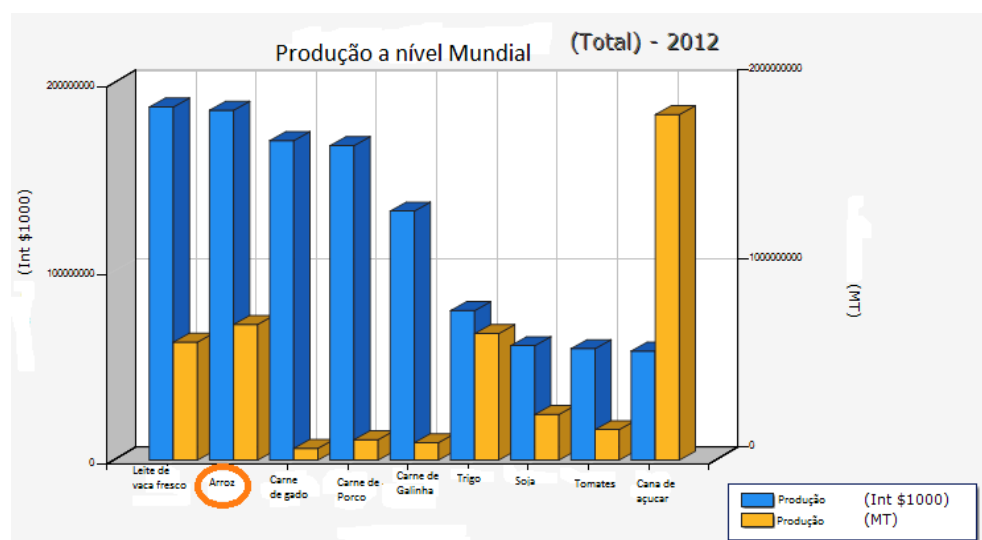
Cereais	Produção (t)		
	2010	2011	2012
<b>Trigo mole</b>	66 962	47 096	54 722
<b>Trigo duro</b>	15 615	3 907	4 268
<b>Milho</b>	626 222	810 267	848 665
<b>Centeio</b>	17 553	18 388	14 784

**Tabela 2.14:** Produção de cereais em Portugal desde 2010 a 2012. Adaptado de INE (2013) (Continuação).

Cereais	Produção (t)		
	2010	2011	2012
<b>Triticale</b>	25 871	23 492	17 019
<b>Arroz</b>	170 216	184 087	187 028
<b>Aveia</b>	66 145	48 255	30 506
<b>Cevada</b>	30 620	21 000	21 151

## 2.6.2 Produção e consumo de Arroz e outros cereais no Mundo:

O arroz é o segundo produto mais produzido no mundo a seguir à cana-de-açúcar (Figura 2.8)

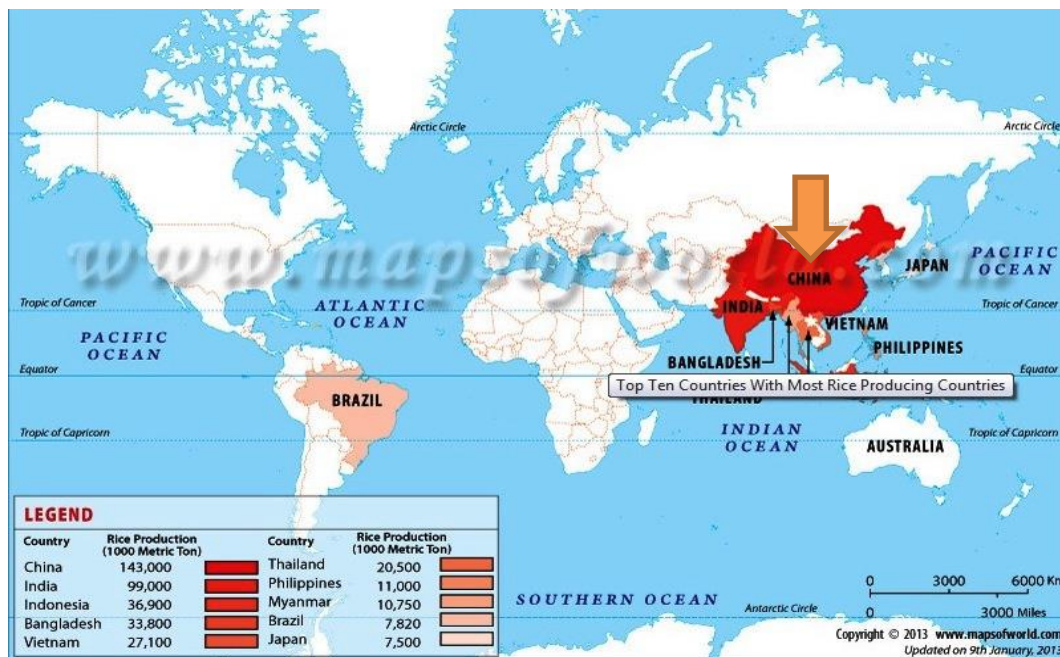


**Figura 2.8:** O Arroz foi em 2012 o segundo produto mais produzido (Circulo Laranja a realçar o arroz-Rice). Adaptado de FAOSTAT (<http://faostat.fao.org/>).

No caso do arroz *Oryza sativa* L. é um dos cereais de maior consumo em todo mundo, possui características que lhe proporcionam ser um dos alimentos com melhor categoria nutricional.



Só na Ásia, mais de 2.000 milhões de pessoas obtêm cerca de 60-70% das suas calorias provenientes de arroz e seus produtos. A ásia representa mais de 90% da produção mundial de arroz em que a China, Indonésia e a Índia são os maiores produtores (Figura 2.9).



**Figura 2.9:** A produção do arroz a nível mundial. A China, a Indonésia e a Índia são os países com uma maior produção de arroz (seta laranja). Adaptado de <http://www.mapsofworld.com/>.

O arroz tem alimentado um grande número de pessoas do continente Asiático por um longo período de tempo, mais do que qualquer outra cultura alimentar. Na Ásia, a capacidade de produzir um grande número de milhões de toneladas de arroz tem ajudado no desenvolvimento das comunidades, ao passo que o desastre de uma cultura do arroz levou a fome generalizada, à morte e à instabilidade política em muitos países em toda longa história do continente. Os principais países exportadores de arroz são a Índia, Vietname, Tailândia, Paquistão e EUA. O arroz tem um preço mais elevado do que o trigo no mercado internacional, no entanto apenas 7% do arroz produzido é negociado no mercado mundial em contraste com 16% do trigo (FAO, 2010).



### 3. CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA:

A SGS foi fundada em 1878 em Rouen como um entreposto Francês para a inspeção do comércio internacional de cereais a granel, a companhia foi registada como *Société Générale de Surveillance* (figura 3.1) em 1919, em Genebra. Atualmente a SGS é a maior organização mundial no domínio da Inspeção, Verificação, Análise e Certificação, com sede em Genebra, Suíça. Esta empresa está presente em cerca de 140 países operando em mais de 1.500 escritórios e laboratórios com o logotipo apresentado na figura 3.1.



**Figura 3.1:** Logotipo da empresa SGS,S.A. Adaptado de <http://www.sgs.pt/> .

A SGS Portugal foi fundada em 1922 pelo grupo SGS, tendo determinado que esta afiliada desenvolvesse a sua atividade pelos mesmos princípios geradores da ação do próprio Grupo a Independência, a Integridade, a Confidencialidade e a Inovação.

Originalmente dedicada ao controlo de operações de carga e descarga de cereais a granel, a SGS Portugal foi alargando a sua atividade a outros setores adaptando-se às exigências do mercado. Os serviços abrangem inspeções, análises e ensaios, verificação metrológica acreditada, inspeções e auditorias técnicas nos mais diversos ramos. Possuindo laboratórios acreditados nas áreas Agroalimentar, Detergentes, Produtos de Higiene, Cosméticos, Dispositivos Médicos, Ensaios Não Destrutivos, Ambiental e Segurança Ocupacional. A SGS assegura que os seus produtos cumprem os padrões internacionais, garantindo assim a segurança do consumidor.

Atualmente os principais serviços prestados encontram-se divididos em quatro categorias:

- **Inspeção:** A SGS, como líder mundial, em serviços de inspeção e verificação, oferece ao público, um leque de serviços que passam pela verificação da condição e do peso dos bens comercializados, no momento de transporte,

visando ajudar no controlo de quantidade e qualidade das mercadorias e em paralelo cumprir com todos os requisitos regulamentares de diferentes regiões e mercados.

- **Análise:** Através de profissionais especializados e experientes, a rede global de laboratórios para a realização de análises, apoia-se na redução de riscos, na agilização de processos dos seus clientes e na verificação da qualidade, segurança e desempenho dos produtos, de acordo com as normas regulamentares de saúde e segurança.
- **Verificação:** Enquanto líder em verificação, a SGS oferece níveis incomparáveis de precisão, especialistas altamente experientes, as mais avançadas metodologias de análises e alcance global. Permite ajudar o cliente, a garantir a conformidade dos seus produtos, serviços e processos com as normas nacionais e internacionais, seja qual for o setor em questão.
- **Certificação:** A SGS ainda permite a certificação dos produtos, processos e sistemas de gestão, dos seus clientes com base na conformidade com as normas e regulamentações nacionais e internacionais ou com as normas definidas pelo cliente.

O laboratório alimentar da SGS é composto pela sala de receção de amostras, laboratório de química e laboratório de microbiologia onde foi desenvolvido o estágio. O laboratório agroalimentar SGS foi fundado há 25 anos de modo a dar suporte ao controlo de operações de cereais. A partir daí começou a desenvolver as análises de microbiologia clássica, tendo neste momento uma posição vigorosa e consistente no mercado a nível de análises nutricionais.

### 3.1 Caracterização do laboratório de microbiologia

O laboratório da SGS Portugal é acreditado como tal segue todos os requisitos gerais descritos na norma de acreditação de laboratórios de ensaio e de calibração. Ao ser acreditado por esta norma, o laboratório demonstra que gere um sistema de qualidade capaz de produzir resultados tecnicamente válidos. Um dos aspetos para se obter resultados válidos é evitar a contaminação cruzada, com tal, a planta do laboratório foi concebida de maneira a que a amostra siga o percurso de “Marcha em Frente”.

O laboratório de microbiologia tem as áreas de ensaio e as áreas anexas. Das áreas ensaio pertencem:

- **Receção e Registo de Amostras:** sala onde é recebida e registada a amostra, segundo código de referência interno, o que permite identificar a amostra. O boletim com as determinações que o cliente quer é sempre elaborado nesta área;

- **Sala de reagentes e amostras:** Assim que as amostras dão entrada, são guardadas no frigorífico das amostras, que se situa nesta sala. Aqui são também guardados os meios de cultura, suplementos e reagentes.
- **Sala de preparação das amostras (Micro Box):** Local onde a amostra é pesada e diluída rigorosamente, com solvente próprio, em rigorosas condições de assepsia segundo a norma NP1829 de 1982.
- **Sala de análises:** Existem duas câmaras de fluxo laminar onde são feitas as análises. São feitas as diluições necessárias ao procedimento das análises (NP -2079/89). A inoculação é feita para caixas de Petri por espalhamento ou incorporação, ou ainda para meios líquidos ou semi-sólidos em tubos de ensaio. Antes de se proceder à análise são marcadas as placas ou tubos com o respetivo número da amostra, diluição correspondente e meio no qual vai ser inoculada a amostra (somente nas placas). Os tubos e as placas são marcados conforme as determinações descritas no boletim das amostras.
- **Sala de estufas:** local onde estão colocadas as várias estufas necessárias à incubação das amostras inoculadas nos respetivos meios de cultura, durante o tempo necessário ao crescimento de cada microrganismo, descrito em normas ou procedimentos internos.
- **Sala de leituras e repicagens:** depois de incubados, os microrganismos são contados. A leitura faz-se por contagem de UFCs (Unidades Formadoras de Colónias), nos diferentes meios, sendo registados os resultados obtidos (segundo a Norma 4129/91). São também retirados os resultados das pesquisas. Esta é a fase final de algumas análises, no entanto, outras têm ainda que ser repicadas /passadas para meios seletivos, submetidas a testes de confirmação das colónias suspeitas obtidas (APi, Mini Vidas), testes de coagulase, etc. O tratamento dos resultados também está descrito em normas/procedimentos internos. A sua apreciação é feita com base nos limites estabelecidos legalmente, ou, quando não há limites legais, pelos limites estabelecidos pelo cliente.
- **Sala de descontaminação lavagem do material:** todo o material que entra em contacto com as amostras ou matéria contaminada, tem que ser descontaminado. Existe uma pessoa que trata a descontaminação e lavagem do material.
- **Sala de preparação de meios de cultura e esterilização de material:** Para haver crescimento de microrganismos, estes têm que ter as condições próprias para o seu crescimento. Entre elas estão os nutrientes necessários à sua vida. Os meios de cultura servem para satisfazer ou inibir o crescimento. Os meios são então preparados nesta sala. Para além da preparação e esterilização dos meios, o material limpo é também aqui esterilizado.



#### 4. METODOLOGIA:

O objetivo da normalização é o estabelecimento de soluções, por consenso das partes interessadas, para assuntos que têm carácter repetitivo, tornando-se uma ferramenta poderosa na autodisciplina dos agentes ativos dos mercados, ao simplificar os assuntos e evidenciando ao legislador se é necessária regulamentação específica em matérias não cobertas por normas. Uma norma é um documento estabelecido por consenso e aprovado por um organismo reconhecido, que fornece regras, linhas diretrizes ou características, para atividades ou sectores de atividade, garantindo um nível de ordem ótimo num dado contexto.

As Normas Portuguesas (NPs) são, regra geral, elaboradas por Comissões Técnicas de Normalização, pelas quais é assegurada a possibilidade de participação de todas as partes interessadas. A harmonização legislativa e a normalização são meios fundamentais para a garantia da livre circulação de produtos e da não distorção de práticas comerciais no mercado comunitário, além de constituírem um instrumento importante na eficácia das políticas comunitárias em matérias de defesa do consumidor e proteção do ambiente. As normas europeias são desenvolvidas quando existe uma necessidade significativa da indústria, do mercado ou do público ( <http://www.ipq.pt/> ).

A *Internacional Organization for Standardization* (ISO) é o organismo internacional de normalização que é responsável pela publicação da maior parte dos referenciais normativos reconhecidos internacionalmente. A ISO, criada em 1947, é uma organização não-governamental sediada em Genebra, responsável pela elaboração e aplicação das normas internacionais de qualidade.

De acordo com IPAC (Instituto Português de Acreditação) a experiência adquirida nos últimos anos na aplicação dos requisitos da Norma NP EN ISO/IEC 17025 e guia EA-04/10, com a recente publicação e normas relacionadas com esta atividade tornaram-se necessárias que se definissem as estratégias de avaliação dos laboratórios de microbiologia.

Uma validação de um método é a confirmação, através da análise e da apresentação objetiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização são cumpridos. Prende-se que, na validação dos métodos microbiológicos, todas as regras gerais sejam cumpridas em toda a execução dos ensaios laboratoriais ajudando assim a obter resultados comparáveis com outros laboratórios. Este facto contribui para a segurança dos técnicos de laboratório, prevenindo assim riscos de infeção (IPAC, n.d.).

#### 4.1 Material e métodos:

Pretende-se com este trabalho que seja implementada uma metodologia para determinação de *Bacillus cereus* em matrizes alimentares à base de cereais (nomeadamente arroz). A metodologia a implementar tem por base um procedimento específico (EN ISO 7932:2005), dando resultados com maior rapidez que o método tradicional (ISO 7932:2004) e foi desenvolvido pela empresa Bio-Rad®.

Segundo o procedimento operacional do laboratório de microbiologia da SGS para implementação de métodos, o laboratório deverá realizar as análises de rotina laboratorial utilizando o novo método em paralelo com a norma de referência correspondente. Caso o método a implementar seja referente a contagens (caso deste trabalho-deteção e enumeração de *Bacillus cereus*), os resultados deverão ser analisados de forma a obter resultados dentro do mesmo ciclo logarítmico. O procedimento operacional do laboratório também menciona que para a implementação de métodos deverão ser feitas análises em paralelo em pelo menos 10 amostras tendo como critério de aceitação:

- **Nas contagens:** os resultados deverão estar dentro do mesmo ciclo logarítmico;
- **Nas pesquisas:** os resultados deverão ser concordantes.

##### 4.1.1 Amostragem:

De acordo como guia para controlo de qualidade em laboratórios de microbiologia redigido pela IPAC, uma amostra é uma parte idealmente representativa de uma dada população, retirada desta de modo discreto ou contínuo, com a finalidade de nela serem examinadas certas características.

As amostras de produtos alimentares analisadas, durante o estágio curricular, não foram recolhidas pelo estagiário pelo que todas as amostras manuseadas pelo estagiário são amostras que pertencem a clientes que trabalham com o laboratório de microbiologia da SGS. Qualquer tipo de informação (origem do produto, local da recolha, estabelecimento a que pertencia a amostra, etc.) que ponha em causa a integridade da empresa não será divulgado nesta dissertação. A SGS respeita e protege a informação confidencial que lhe é confiada pelos clientes e terceiros e toma medidas adequadas para evitar divulgação por acidente. Assim sendo, a SGS adquire e mantém os dados dos clientes na medida do necessário para o funcionamento eficaz do seu negócio ou para cumprir com os requisitos legais.

No estágio foram analisadas 15 amostras (Tabela 4.1) de arroz e produtos à base de cereais em que 11 das 15 amostras eram produtos prontos para consumo humano, de



estabelecimento desconhecidos, e 4 das 15 amostras eram produtos secos desidratados (Amostra 7, 8, 9 e 10) de fabricantes desconhecidos. Todas as amostras alimentares, analisadas e executadas com o intuito de detecção do *Bacillus cereus*, foram registadas e analisadas na rotina laboratorial da empresa.

**Tabela 4.1:** Identificação e descrição das amostras analisadas para a detecção de *Bacillus cereus* no estágio curricular.

Identificação da Amostra	Descrição da amostra
<b>Amostra 1</b>	Esparguete normal marca <i>A</i>
<b>Amostra 2</b>	Arroz com legumes
<b>Amostra 3</b>	Arroz branco tipo Agulha
<b>Amostra 4</b>	Esparguete normal marca <i>B</i>
<b>Amostra 5</b>	Arroz branco tipo <i>Basmati</i>
<b>Amostra 6</b>	Arroz com espinafres
<b>Amostras 7</b>	Farinha de trigo tipo 55
<b>Amostra 8</b>	Farinha integral de trigo e centeio
<b>Amostra 9</b>	Farinha láctea de arroz
<b>Amostra 10</b>	Farelo de trigo
<b>Amostra 11</b>	Massa com natas e fiambre
<b>Amostra 12</b>	Arroz com peixe
<b>Amostra 13</b>	Massa com peru
<b>Amostra 14</b>	Espaguete com guisado
<b>Amostra 15</b>	Arroz de pato

Durante o período de estágio diversos produtos deram entrada no laboratório cujo pedido de análise microbiológica incluía a pesquisa de *Bacillus cereus*. No entanto em

nenhuma amostra se detetou o agente em estudo, *Bacillus cereus*. Por este facto, com o objetivo de validar o método, e por decisão do laboratório, contaminou-se, quatro das amostras seleccionadas, com um material de referência o *Bacillus cereus* ATCC 11778, pertencente ao laboratório.

As amostras contaminadas foram as amostras 1 (Esparguete normal marca A), 3 (Arroz branco tipo Agulha), 7 (Farinha de trigo tipo 55) e 9 (Farinha láctea de arroz).

#### **4.1.2 Métodos:**

##### **4.1.2.1 Método horizontal para a enumeração e presunção de *Bacillus cereus* a 30 °C - ISO 7932:2004**

O método que a empresa SGS utiliza para a enumeração de *Bacillus cereus*, em produtos alimentares, é seguido pela norma ISO 7932:2004.

A ISO 7932:2004 fornece uma orientação geral para o teste microbiológico de produtos alimentares preparando métodos de ensaio microbiológicos para aplicação a alimentos ou rações para animais. Devido à grande variedade de produtos dentro deste campo de aplicação, essas diretrizes podem não ser apropriadas em cada detalhe, para certos produtos, podendo ser necessário o uso de métodos diferentes.

Verifica-se que a grande maioria dos esporos das estirpes de *B. cereus* germinam rapidamente sobre a superfície do meio de cultura usado para a enumeração. Na maioria dos casos, não é necessário o tratamento de choque por calor para provocar a germinação.

Esta Norma especifica um método horizontal para a enumeração de *Bacillus cereus* presumível viável por meio da técnica de contagem de colónias a 30 °C. É aplicável para:

- Subprodutos destinados ao consumo humano e na alimentação de animais
- Amostras ambientais na área de produção de alimentos e manipulação de alimentos.

A fim de dispor de um método de teste possível, a fase de confirmação foi restrita ao aspeto típico em agar e ao teste de hemólise. Assim, o termo "presuntivo" foi introduzido para reconhecer o facto de que a fase de confirmação não permite observar a distinção de *B. cereus*, a partir de outros intimamente relacionados mas menos vulgarmente encontrados as espécies de *Bacillus*, tais como *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*. Um teste adicional da motilidade pode ajudar a diferenciar *B. cereus* de *B. anthracis*, nos casos em que se suspeita da presença deste último.

#### 4.1.2.1.1 Meio BCM (*Bacillus cereus* Medium):

O meio utilizado pela empresa, para a enumeração de *Bacillus cereus*, é o meio BCM (*Bacillus cereus* Medium). A preparação e a constituição deste meio seguem todos os requisitos da norma ISO 7932:2004 sendo estes requisitos os seguintes (valores para 900 mL de água destilada):

- Peptona -10,0 g
- Extrato de carne -1,0 g
- Cloreto de sódio – 10,0 g
- D- Manitol – 10,0 g
- Agar- 12,0 g – 18,0 g
- Vermelho de fenol -0,025 g

O pH deverá ser mantido  $7,2 \pm 0,2$ .

O meio utilizado pela empresa SGS, BCM (*Bacillus cereus* Medium) da LAB M® tem a seguinte constituição (valores para 900 mL de água destilada):

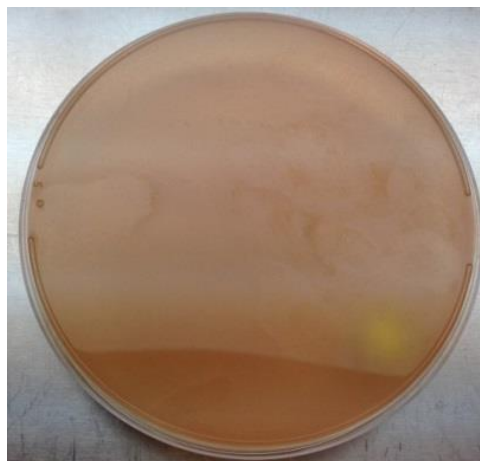
- Peptona -10,0 g
- Extrato de carne -1,0 g
- Cloreto de sódio – 10,0 g
- D- Manitol – 10,0 g
- Agar- 15,0 g
- Vermelho de fenol -0,025 g

O pH deverá ser mantido  $7,2 \pm 0,2$  a 25°C.

A preparação do meio BCM iniciou-se com a pesagem de 23,0 g de meio desidratado (*Bacillus cereus* Medium – LAB M®) na balança analítica (Mettler PM 1200). Seguidamente adicionou-se 450 mL de água destilada ao meio desidratado, previamente pesado, à água destilada, previamente medida, numa panela e aqueceu-se numa placa de aquecimento (J.P. Selecta, S.A) durante 5 minutos. De seguida transferiu-se os 450 mL de meio BCM para um frasco de 500 mL de capacidade volumétrica e

Colocou-se o frasco na autoclave (Uniclave 88) à temperatura de 121 °C durante 15 minutos. Após a esterilização terminada deixou-se o meio arrefecer até aos 47 °C dentro do equipamento de banho-maria que tinha temperatura de  $45 \pm 1$  °C. Seguidamente, após prévio arrefecimento do meio BCM, adicionou-se 50 mL solução de gema de ovo com Polimixina B (Egg Yolk Emulsion + Polimixina B Biokar Diagnostics®) de forma asséptica na câmara de fluxo laminar horizontal (ESI Fluframe). Agitou-se o frasco de modo circular durante 40 segundos de forma a dissolver a solução de gema de ovo com Polimixina B. Distribuiu-se 15 mL do meio por

cada placa de Petri e esperou-se até a solidificação das mesmas. Por fim após a solidificação armazenou-se as placas de Petri com o meio BCM (Figura 4.1) no frigorífico (Eurofred) a uma temperatura de  $13\pm 3^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 4.1:** Placa de Petri distribuída com meio BCM.

O princípio do meio específico para *Bacillus cereus* foi desenvolvido por Mossel e colaboradores. O meio de cultura BCM é um meio seletivo devido à sua constituição (D-Manitol) e à adição da solução de gema de ovo com Polimixina B. A gema de ovo permite detetar a lecitinase produzida pelo *Bacillus cereus* e a Polimixina B inibe a microflora de outras espécies de bactérias em concreto *Escherichia coli* ([www.labm.com](http://www.labm.com)).

#### **4.1.2.1.2 Meio MYP (Mossel):**

O método a ser implementado e validado, na empresa SGS, para deteção de *Bacillus cereus* em produtos alimentares nomeadamente arroz e outros produtos à base de cereais aponta a utilização do meio MYP-Mossel da Bio-rad®.

O meio MYP é usado para a deteção e enumeração de *Bacillus cereus* na técnica de contagem de colónias a  $30^{\circ}\text{C}$  para análises a produtos alimentares. Este método é baseado na norma NF EN ISO 7932 (Julho/2005) que visa a enumeração e presunção de *Bacillus cereus*.

O princípio do meio baseia-se na incapacidade do *Bacillus cereus* de fermentar o manitol (manitol é uma fonte de glúcidos e a sua fermentação é detetada pelo indicador de pH vermelho de fenol) e na manifestação de lecitinase. A adição de gema de ovo fornece ao *Bacillus cereus* a proteína lecitina que faz com que este microrganismo produza lecitinase. A lecitinase vai hidrolisar a lecitina do ovo formando uma zona de precipitação branca em redor das colónias formadas. A zona de precipitação é composta por produtos de degradação da

lecitina. Devido à presença de sulfato polimixina B no próprio meio desidratado, o crescimento de outras bactérias é inibido.

A preparação e a constituição deste meio seguem todos os requisitos da norma EN ISO 7932:2005 sendo estes requisitos os seguintes (valores para 900 mL de água destilada):

- Peptona -10,0 g
- Extrato de carne -1,0 g
- Cloreto de sódio – 10,0 g
- D- Manitol – 10,0 g
- Agar- 12,0 g – 18,0 g
- Vermelho de fenol -0,025 g
- Sulfato de polimixina B-10<sup>5</sup> IU

O pH deverá ser mantido 7,2±0,2 a 25°C.

O meio a ser implementado e validado, na empresa SGS, é o MYP (Mossel) da Bio-rad® tem a seguinte constituição:

- Peptona -10,0 g
- Extrato de carne -1,0 g
- Cloreto de sódio – 10,0 g
- D- Manitol – 10,0 g
- Agar- 14,0 g
- Vermelho de fenol -0,025 g
- Sulfato de polimixina B-10<sup>5</sup> IU

O pH deverá ser mantido 7,2±0,2 a 25°C.

Para a preparação do meio MYP pesou-se 22,5 g de meio desidratado (Mossel – Bio-rad®) na balança analítica (Mettler PM 1200). Adicionou-se 450 mL de água destilada ao meio desidratado e aqueceu-se numa placa de aquecimento (J.P. Selecta, S.A) durante 5 minutos. Transferiu-se os 450 mL de meio MYP para um frasco de 500 mL de capacidade volumétrica e onsecutivamente colocou-se o frasco na autoclave (Uniclave 88) à temperatura de 121°C durante 15 minutos.

Após a esterilização terminada deixou-se o meio arrefecer até 44-47°C dentro do equipamento de banho-maria que tinha temperatura de 45±1°C. Seguidamente, após prévio arrefecimento do meio MYP, adicionou-se 50 mL solução de gema de ovo simples (*Egg Yolk Emulsion Biokar Diagnostics®*) de forma asséptica na câmara de fluxo laminar horizontal (ESI Fluframe). Agitou-se o frasco de modo circular durante 40 segundos de forma a dissolver a solução de gema de ovo. Por fim distribuiu-se 15 mL por cada placa de Petri. Após solidificação

armazenou-se as placas de Petri com o meio MYP (Figura 4.2) no frigorífico (Eurofred) a uma temperatura de  $13\pm 3^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 4.2:** Placa de Petri distribuída com meio MYP na fase de solidificação dentro da câmara de fluxo laminar.

#### 4.1.3 Preparação das amostras:

As amostras foram preparadas de forma igual para ambos os métodos (método utilizado na empresa e método a ser implementado). Segundo a ISO 7932:2004 a preparação da amostra a ser analisada deverá ter uma quantidade específica caso a amostra seja líquida. Por outro lado, se a amostra analisada for um produto que não seja líquido, proceder-se-á à preparação de uma suspensão inicial e respetivas diluições sucessivas. Para tal, a ISO 7932:2004 indica que a suspensão inicial e as diluições sucessivas deverão ser realizadas de acordo com a ISO 6887-1:1999. Esta norma define as regras gerais para a preparação da suspensão inicial e diluições decimais para exames microbiológicos e realça que para um certo número de produtos, é necessário tomar precauções especiais, particularmente na preparação da suspensão inicial, devido ao estado físico do produto (tal como um produto seco ou um produto altamente viscoso), ou a presença de substâncias inibidoras (tais como especiarias, peixes salgados), ou a acidez, etc.

Para realização da suspensão inicial e das diluições sucessivas utilizou-se água peptonada (BPW-Buffered peptone water) conforme indicado na norma ISO 6887-1:1999. A constituição da água peptonada deverá respeitar os requisitos incluídos na norma ISO 6887-1:1999, os quais abaixo estão indicados (valores para 1000 mL de água destilada):

- Peptona de caseína e de gelatina (tecido animal) - 10,0 g
- Cloreto de sódio - 5,0 g
- Di-sódio hidrogenofosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) - 9,0 g

➤ Dihidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) -1,5 g

O pH deverá ser mantido  $7,0 \pm 0,2$  a  $25^\circ\text{C}$ .

A água peptonada tem como função promover a recuperação dos microrganismos presentes potencialmente lesados como consequência dos tratamentos a que o produto foi sujeito. A suspensão inicial (diluição primária) tem por finalidade transformar a heterogeneidade de uma amostra sólida, numa amostra líquida, homogênea e representativa do alimento a analisar. O objetivo será obter uma distribuição o mais homogênea possível dos microrganismos contidos nos componentes sólidos da amostra. Posteriormente foram preparadas diluições decimais sucessivas, de modo a reduzir o número de microrganismos por unidade de volume semeado e permitir assim efetuar uma contagem de UFC, após o período de incubação, conforme descrito em cada norma específica utilizada (ISO 7932:2004 e EN ISO 7932:2005).

#### **4.1.3.1 Preparação da água peptonada (BPW):**

Na preparação do BPW pesou-se 20,0 g de meio desidratado (BPW®) na balança analítica (Mettler PM 1200) para um frasco de 1000 mL de capacidade volumétrica e adicionou-se 1000 mL de água destilada. Seguidamente colocou-se o frasco na autoclave (Uniclave 88) à temperatura de  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Após a esterilização terminada deixou-se o meio arrefecer e colocou-se no frigorífico à temperatura de  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ .

#### **4.1.3.2 Pesagem das amostras:**

As amostras (Figura 4.3) foram pesadas tendo em conta as condições de assepsia, na sala de pesagens do laboratório através do diluidor automático com balança (AES Laboratoire). Pesou-se 25,0 g de cada amostra para uma saco de Stomacher perfazendo com água peptonada até às 250 g. Desta forma obteve-se a diluição inicial (p/p) da amostra na proporção 1/10 usando como diluente a água peptonada (meio BPW).

Todas as misturas de amostra com água peptonada foram homogeneizadas no aparelho “Stomacher®” (Stomacher 400 “Laboratory Blender), durante 1 minuto, a 230 rpm.

Seguidamente, foram preparadas diluições decimais seriadas da suspensão-mãe, de modo a se obter o número apropriado de microrganismos para a contagem em meio de cultura sólido utilizando a técnica de sementeira em superfície. Foram preparadas duas placas de meio para cada diluição examinada.



**Figura 4.3:** Algumas das 15 amostras analisadas antes de ser preparada a suspensão inicial para detecção de *Bacillus cereus* (imagem do lado esquerdo). Algumas das 15 amostras após se ter pesado a suspensão inicial (imagem do lado direito).

#### 4.1.3.3 Contaminação das amostras:

A contaminação das amostras foi executada a partir de um material de referência, o *Bacillus cereus* ATCC 11778. Isolou-se o mesmo numa placa de Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS Bio-rad®). A placa COS® foi colocada na estufa de 30°C (Binder). Após 24 horas retirou-se a placa da estufa e retirou-se uma colónia e inoculou-se em cada saco *Stomacher* pertencente a cada uma das amostras 1, 3, 7 e 9 (Figura 4.4).



**Figura 4.4:** Amostra 1, 3, 7 e 9 após contaminação com o *Bacillus cereus* ATCC 11778.



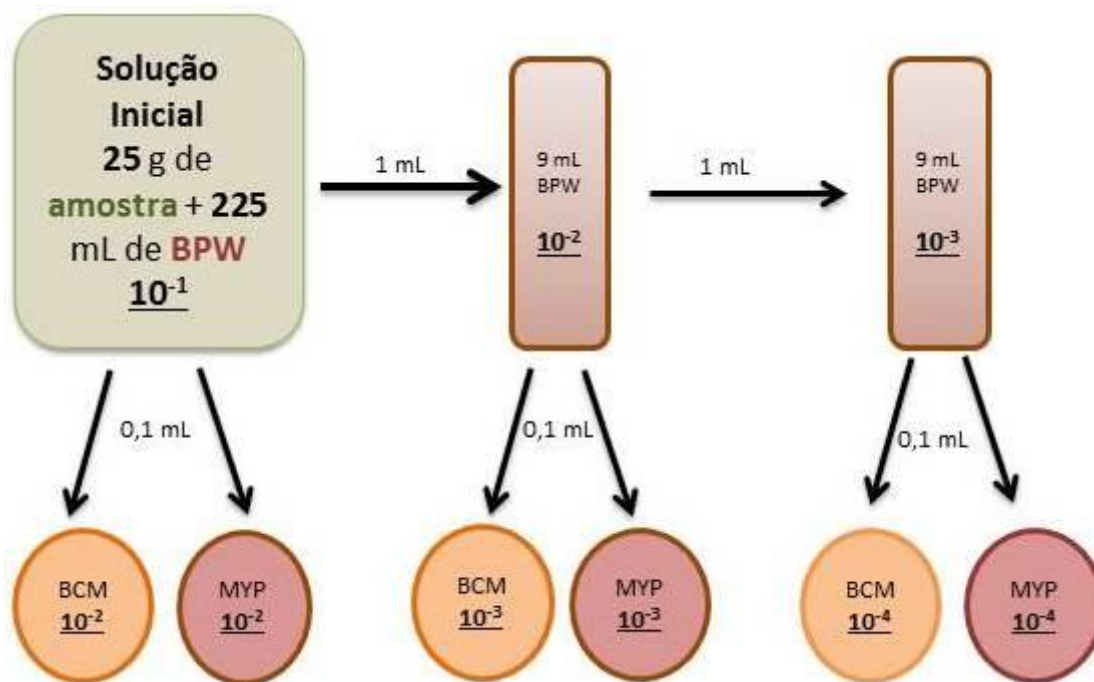
A gelose Columbia (Figura 4.5) é um meio de isolamento seletivo que permite o crescimento de microrganismos fastidiosos. Complementado, com sangue de carneiro, é altamente nutritivo e portanto adaptado à cultura da maior parte das espécies bacterianas, independentemente do seu metabolismo (<http://www.biomerieux.pt>).



**Figura 4.5:** *Bacillus cereus* ATCC 11778 em Placa de Gelose de sangue (crescimento após 24 horas a 30 °C).

#### 4.1.3.4 Preparação das diluições decimais:

Fez-se, para cada amostra, diluições decimais sucessivas até à diluição  $10^{-4}$ , com base no nível de contaminação esperado. Esta metodologia consiste em adicionar 1 mL da suspensão inicial a 9 mL de água peptonada preparando assim a diluição  $10^{-2}$ . A partir desta, é preparada de igual modo a diluição  $10^{-3}$  e assim sucessivamente (Figura 4.6).



**Figura 4.6:** Esquema da preparação das diluições sucessivas, executados em cada uma das amostras estudadas; Quadrado verde: Saco *Stomacher* com 25,0 g de cada amostra (amostra1 a amostra15) mais 225 mL de BPW® (água peptonada); Seta preta: retirou-se  $x$  mL do anterior para o seguinte;  $x = 1$  ou  $x = 0,1$ ; Cilindro castanho: Tubo de ensaio com 9 mL de BPW® (água peptonada); Círculo de cor Salmão: Placa BCM® (*Bacillus cereus Medium*); Círculo de cor Rosa escura: Placa MYP® (Mossel).

#### 4.1.4 Inoculação da suspensão inicial e respectivas diluições decimais nos meios BCM e MYP e Incubação a 30°C:

A partir da suspensão inicial (diluição inicial  $10^{-1}$ ), efetuou-se as diluições desejadas conforme já foi referido no subcapítulo 4.1.3.4. Seguidamente inoculou-se sobre a superfície seca do meio MYP® (Mossel) e meio BCM® (*Bacillus cereus Medium*) 0,1 mL de cada diluição selecionada (diluição  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) com a ajuda de pipetador automático (VitLab-pipeo) e de uma pipeta graduada esterilizada de 1 mL. Continuamente, com auxílio de um espalhador esterilizado (Figura 4.7) espalhou-se o inóculo cuidadosamente por toda a superfície do meio até completa absorção. Todo este processo foi executado numa camara de fluxo laminar com o fim de manter toda a esterilidade do procedimento e manuseamento das amostras a serem analisadas.



**Figura 4.7:** Espalhamento do inóculo (da suspensão inicial) na placa MYP®.

Tendo em conta o descrito nas normas ISO 7932:2004 e EN ISO 7932:2005 as placas foram incubadas, de forma invertida a uma temperatura  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 horas, na estufa (Binder) (Figura 4.8) indicada com a temperatura de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ .



**Figura 4.8:** Placas de MYP e BCM na estufa (Binder) de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  após inoculação da amostra a partir das diluições seriadas.

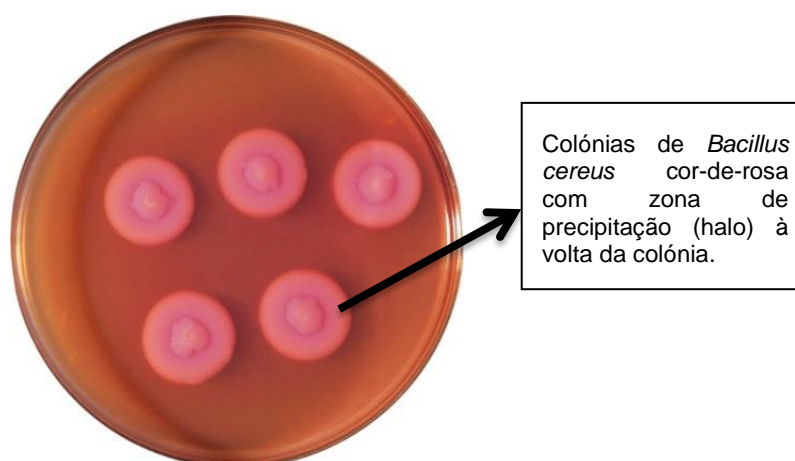
#### 4.1.5 Contagem de colónias características e Testes confirmatórios:

A norma ISO 7932:2004 e a EN ISO 7932:2005 usada atualmente na empresa SGS (para a deteção de *Bacillus cereus* em amostras alimentares) e usada na implementação do

método para enumeração de *Bacillus cereus*, respetivamente, descrevem no ponto 9.3 que após o período de incubação dever-se-á selecionar as placas onde ocorreu crescimento de *B. cereus*, de preferência a seleção de pelo menos duas diluições sucessivas, contendo em cada uma das diluições menos de 150 colónias. A contagem das colónias presuntivas de *B. cereus* deverá ser feita em cada uma das placas. Estas colónias presuntivas (Figura 4.9) são grandes, cor-de-rosa (indicando que a fermentação de Manitol não ocorreu) e geralmente estão rodeadas por uma zona de precipitação (indicando a produção de lecitinase). Se as placas contiverem numerosos microrganismos que fermentam o Manitol, levando assim à produção de ácido, então a tonalidade cor-de-rosa característica da colónia de *Bacillus cereus* pode diminuir ou então desaparecer por completo.

Algumas estipes de *Bacillus cereus* produzem pouco ou nenhuma lecitinase. Colónias destas estipes não estarão cercadas por uma zona de precipitação. Estas colónias também devem ser sujeitas a testes de confirmação.

Se 1 mL de inóculo for espalhado ao longo de três placas, deve-se tratar essas placas como uma em todas as contagens subsequentes e procedimentos de confirmação.



**Figura 4.9:** Placa de Mossel com colonias de *Bacillus cereus*. Adaptado de <http://www.solabia.fr/>.

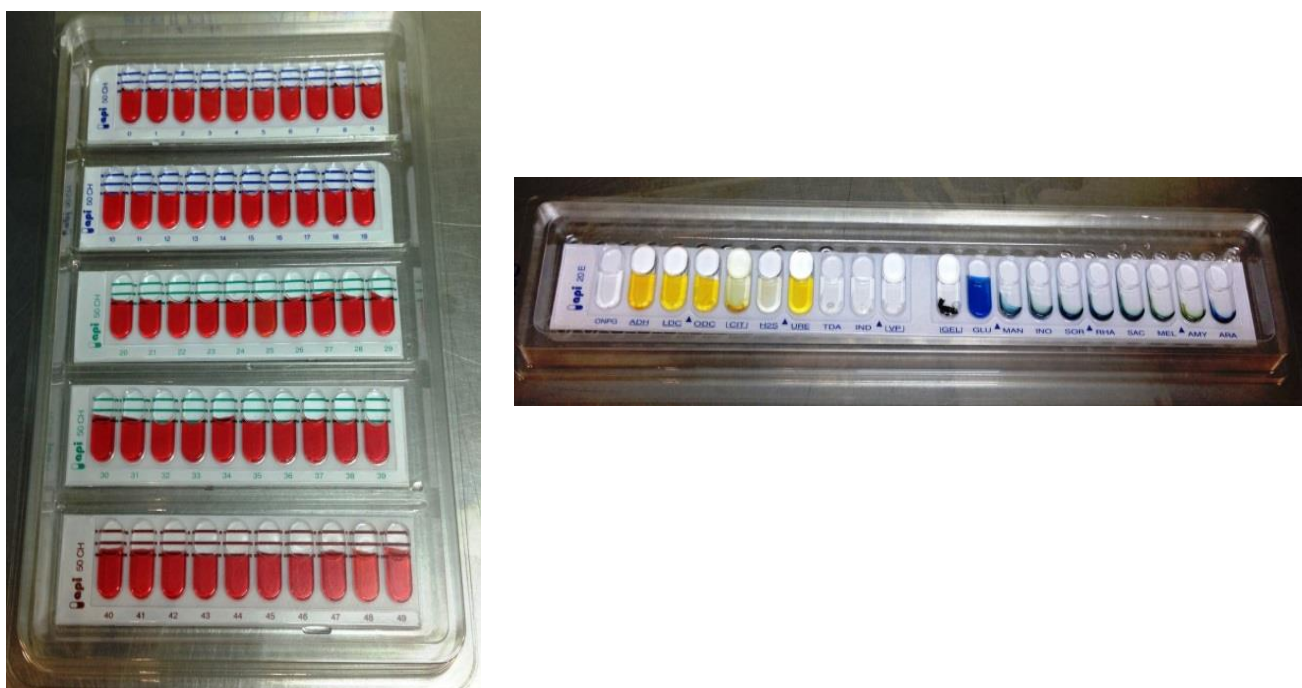
Os testes confirmatórios do método a ser utilizado na empresa SGS para deteção do *Bacillus cereus*, de acordo com a norma ISO 7932:2004 são efetuados sempre que surgirem colónias grandes, de cor rosa e rodeadas por um halo opaco, ou seja, colónias característica de *B. cereus*. Esta confirmação envolve dois testes. O primeiro teste confirmatório consiste na pesquisa da atividade hemolítica em meio COS® (Bio-rad) e sempre que necessário, na deteção de lecitinase. A placa de gelose de sangue constitui uma mistura de peptonas particularmente adaptada à cultura de microrganismos fastidiosos. A presença de sangue permite a determinação da hemólise, que é um critério básico para a orientação da identificação de bactérias nomeadamente do *Bacillus cereus*.

Segundo o procedimento interno da empresa que tem por base a ISO 7932:2004, o segundo teste confirmatório consiste em caracterizar o perfil bioquímico do *Bacillus cereus* utilizando a galeria API CH® e API 20E® (BioMérieux®). O API 50 CH® é um sistema padronizado que associa 50 testes bioquímicos (microtubos) para o estudo do metabolismo dos hidratos de carbono dos microrganismos (fermentação de substratos, pertencente à família dos hidratos de carbono e derivados tais como heterosídeos, poliálcoois, ácidos urónicos).

O API 50 CH® é usado é utilizado com conjunto com API 50 CHB/E Medium para a identificação dos *Bacillus* e semelhantes. A galeria API 20 E® pode ser utilizada em complemento da galeria API 50 CH® para *Bacillus* e semelhantes.

Para a realização das galerias API 50 CH® e API 20E® retirou-se, com uma ansa, várias colónias idênticas entre si e, utilizando o Densitómetro (BioMérieux® densimat), preparou-se uma suspensão no meio API CHB® e no meio API Suspension (BioMérieux®) respetivamente, de turvação equivalente a 2 na escala de McFarland.

Posteriormente preencheu-se os microtubos, de ambas galerias com as suspensões anteriormente descritas (Figura 4.10). A galeria API 20 E® foi preenchida até ao microtubo da Glucose (GLU). Colocou-se as galerias API 50 CH® e API 20E® a incubar a 30°C durante 48 horas, e realizou-se a leitura dos resultados às 24 e às 48 horas.



**Figura 4.10:** API 50 CH® (lado esquerdo) API 20 E® (lado direito) ambos preenchidos com a suspensão respetiva.

O teste confirmatório do método a ser implementado na empresa SGS para deteção do *Bacillus cereus*, de acordo com a norma EN ISO 7932:2005 é efetuado sempre que surgirem

colônias grandes, irregulares, de cor rosa e rodeadas por um halo opaco, ou seja, colônias característica de *B. cereus*. O teste confirmatório consiste na pesquisa da atividade hemolítica em meio COS® e sempre que necessário, na detecção de lecitinase. As geloses de sangue contêm uma mistura de peptonas particularmente adaptada à cultura de microrganismos fastidiosos. A presença de sangue permite a determinação da hemólise, que é um critério básico para a orientação da identificação desta bactéria.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Este capítulo denota todos os resultados obtidos no desenvolvimento experimental assim como a sua devida discussão. Os resultados descritos abrangem todos os diferentes testes realizados nas 15 amostras incluindo a contagem de colónias em placa de MYP® e BCM®, presença ou ausência de hemólise em agar sangue -5%- (Bio-rad®), bem como os resultados do perfil bioquímico identificados através dos testes em galerias API 50 CH® e API 20 E® (BioMérieux®).

Segundo o guia para o controlo de qualidade em laboratórios de microbiologia redigido pelo IPAC quando se valida/implementa um método dever-se-á fazer um controlo interno com amostras em duplicado e ensaios em paralelo. No presente trabalho experimental, por impossibilidade de recursos, não foi possível fazer as análises em duplicado

Na primeira fase do procedimento prático laboratorial contaminou-se artificialmente 4 das 15 amostras com uma estirpe de referência do laboratório da SGS (como foi anteriormente mencionado no subcapítulo 4.1.3.3). As amostras contaminadas artificialmente foram: a amostra 1, esparguete normal marca A; amostra 3, arroz branco tipo agulha; amostra 7, farinha de trigo tipo 55, e a amostra 9, farinha láctea de arroz. Devido a este procedimento foi possível determinar e enumerar, nestas amostras, o *Bacillus cereus* a 30 °C pelo método horizontal ISO 7932:2004, em meio BCM-LABM® (meio de cultura usado no método para determinação e enumeração de *B. cereus* utilizado no laboratório SGS), e pelo método horizontal EN ISO 7932:2005, em meio o MYP-Bio-Rad® (meio de cultura utilizado no método a ser implementado).

Os resultados obtidos nas contagens de *Bacillus cereus* são apresentados em tabela (Tabela 5.1). As contagens, realizadas após 24 horas de incubação a 30°C, foram efetuadas diretamente quer em placa de BCM® como em placa de MYP®. Todos os resultados das contagens de colónias características de *Bacillus cereus* foram expressos em Log UFC/g.

Os resultados obtidos em cada método foram analisados através do teste t de *student* e ANOVA, com o objetivo de validar o método a ser implementado (EN ISO 7932:2005).

### 5.1 Resultados das análises microbiológicas realizadas durante o desenvolvimento do trabalho.

Os resultados obtidos no teste presuntivo da contagem de *Bacillus cereus*, utilizando o método a ser implementado (EN ISO 7932:2005) em paralelo com a norma de referência correspondente utilizada atualmente na empresa SGS (ISO 7932:2004) são apresentados em tabela (Tabela 5.1) e expressos em Log UFC/g.



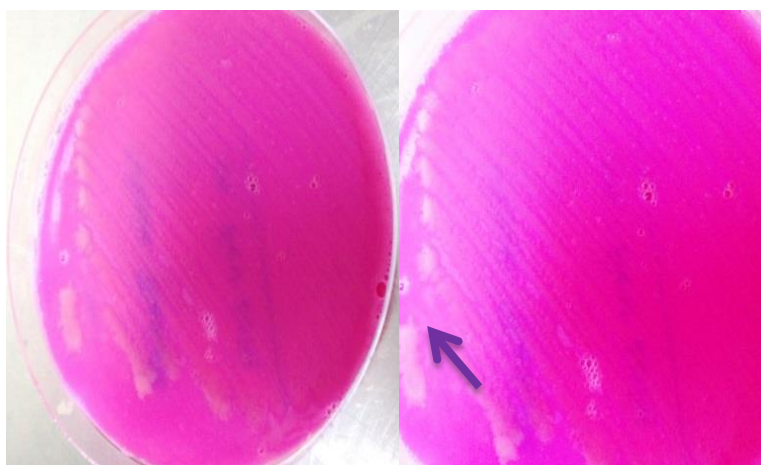
**Tabela 5.1:** Resultados obtidos pelo método ISO 7932:2004 e EN ISO 7932:2005 expressos em Log UFC/g.

Amostra	Data	Descrição	Resultado	Resultado	LOG UFC/g	LOG UFC/g
			Método ISO 7932:2004	Método EN ISO 7932:2005	Método ISO 7932:2004	Método EN ISO 7932:2005
1	07-Março-2014	Esparguete normal marca A	$8,1 \times 10^5$	$9,7 \times 10^5$	5,9	6,0
2	28-Fevereiro-2014	Arroz com legumes	$<10^2$	$<10^2$	0	0
3	07-Março-2014	Arroz branco tipo agulha	$7,6 \times 10^5$	$8,8 \times 10^5$	5,9	5,9
4	28-Fevereiro-2014	Esparguete normal marca B	$<10^2$	$<10^2$	0	0
5	28-Fevereiro-2014	Arroz branco tipo <i>Basmati</i>	$<10^2$	$<10^2$	0	0
6	28-Fevereiro-2014	Arroz com espinafres	$<10^2$	$<10^2$	0	0
7	07-Março-2014	Farinha de trigo tipo 55	$6,3 \times 10^5$	$8,5 \times 10^5$	5,8	5,9
8	28-Fevereiro-2014	Farinha integral de trigo e centeio	$<10^2$	$<10^2$	0	0
9	07-Março-2014	Farinha láctea de arroz	$1,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	6,0	6,0
10	28-Fevereiro-2014	Farelo de trigo	$<10^2$	$<10^2$	0	0
11	28-Fevereiro-2014	Massa com natas e fiambre	$<10^2$	$<10^2$	0	0
12	28-Fevereiro-2014	Arroz com peixe	$<10^2$	$<10^2$	0	0
13	28-Fevereiro-2014	Massa com peru	$<10^2$	$<10^2$	0	0
14	28-Fevereiro-2014	Esparguete com guisado	$<10^2$	$<10^2$	0	0
15	28-Fevereiro-2014	Arroz de pato	$<10^2$	$<10^2$	0	0



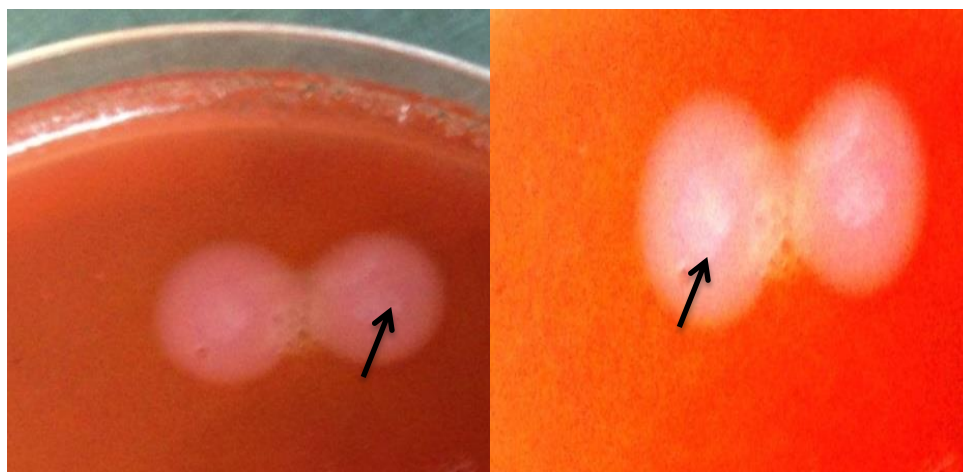
Os resultados, da detecção e enumeração de *Bacillus cereus*, obtidos a partir de ambos os métodos (ISO 7932:2004 e EN ISO 7932:2005) foram alcançados após a execução da sementeira. Ambas as placas MYP® e BCM® foram incubadas a 30°C durante 24 horas e, após esse tempo, foi possível observar em ambas as placas, a presença ou ausência de precipitação da lecitina e a alteração ou não, da cor para rosa.

Detetou-se nas amostras 1 (espagete normal marca A), 3 (arroz branco tipo agulha), 7 (farinha de trigo tipo 55) e 9 (farinha láctea de arroz) resultados positivos e assertórios em ambos os métodos. A contagem de colónias características de *B. cereus* somente foi possível na diluição  $10^{-4}$  pois nas diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  verificou-se um extenso crescimento de colónias que tornou a contagem inexecutável (Figura 5.1).



**Figura 5.1:** Colónias incontáveis de *Bacillus cereus* em Placa de MYP® (à direita) e BCM® (à esquerda), diluição  $10^{-2}$ . Seta preta: Crescimento abundante de colonias; Seta roxa: meio totalmente rosa devido à elevada carga de UFC/g de alimento.

Na contagem de colónias características de *Bacillus cereus* verificou-se que a morfologia de todas as colónias isoladas, em ambos os meios (BCM e MYP), era idêntica. As colónias apresentavam uma coloração rosa e estavam rodeadas de um halo. De acordo com a ISO 7932:2004 e a EN ISO 7932:2005 as colónias típicas de *Bacillus cereus* são grandes, cor-de-rosa (indicando que a fermentação de Manitol não ocorreu) e geralmente estão rodeadas por uma zona de precipitação (indicando a produção de lecitinase). Seguindo este conceito delineado em ambas ISO, todas as colónias contadas apresentavam estas características (Figura 5.2).



**Figura 5.2:** Colónias características de *Bacillus cereus*, diluição  $10^{-4}$ , no meio MYP® (à esquerda) e BCM® (à direita). Ampliada 3x e 4x, respetivamente. Seta preta: Colónias características de *B. cereus*.

O meio utilizado pela empresa SGS, BCM (*Bacillus cereus* Medium) da LAB M® tem a constituição semelhante à do meio a ser implementado MYP (Mossel) da Bio-rad®. A única diferença na constituição destes meios é o componente Sulfato de polimixina B. Este constituinte faz parte da fórmula teórica do meio MYP ( $1 \times 10^5$  UI) enquanto no meio BCM este componente está contido na solução de gema de ovo com Polimixina B ( $5 \times 10^4$  UI).

Ambos os meios são constituídos por peptona, extrato de carne, cloreto de sódio (NaCl), D- Manitol, agar e vermelho de fenol. Cada constituinte tem uma função específica que possibilita o crescimento e isolamento do *Bacillus cereus*.

A peptona é obtida por digestão enzimática da carne de elevada qualidade e deverá ser adicionada a meios de cultura com ingredientes adicionais como extrato de carne e agar. O nível de triptofano na peptona é suficientemente elevado para permitir a produção de ácido indolacético. A seleção de microrganismos com capacidade para produção de hormonas de crescimento, como o ácido indolacético tem sido amplamente estudada devido à sua função reguladora no desenvolvimento das plantas (El-Khawas & Adachi, 1999).

O extrato de carne contém substâncias que estimulam a atividade bacteriana, nomeadamente vitamina, fontes de carbono e azoto. Já o cloreto de sódio permite o aumento da pressão osmótica e mantém a isotonia do meio.

O agar é uma substância mucilaginosa extraída de várias espécies de *Gelidium* e outras algas afins. Tem somente a função de solidificar os meios, não sendo metabolizado pelas bactérias.

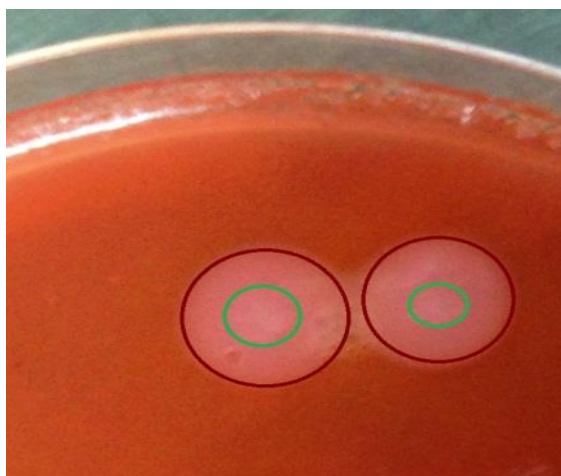
O D-manitol é um açúcar, cuja fermentação é detetada pelo indicador de pH vermelho de fenol. O *Bacillus cereus* não consegue fermentar o manitol, e como resultado as colónias típicas são de tonalidade rosa (Figura 5.3). A solução de vermelho fenol é usada como um indicador de pH: a sua cor apresenta uma gradual transição do amarelo para o vermelho na

faixa de pH entre 6,6 e 8,0. Acima de pH 8,1, o vermelho fenol transita para uma cor rosa brilhante. Esta mudança de cor observada é porque o vermelho de fenol perde prótons à medida que o pH aumenta (Budavari,1989).

A gema de ovo foi uma solução adicionada durante a preparação do meio BCM® e MYP®. A solução de gema de ovo, adicionada ao meio BCM®, possui polimixina B ao contrário da solução de gema de ovo adicionada ao meio MYP®. As polimixinas são antibióticos polipeptídeos com potente ação sobre várias bactérias Gram-negativas. Atualmente, somente as polimixinas B e E são utilizadas na prática clínica. Este grupo de antibióticos são sintetizados por estirpes de *Bacillus polymyxa*, foram descritas de forma independente em 1947 por investigadores norte-americanos e ingleses e o nome genérico de polimixinas foi adotado para os antibióticos originados por este microrganismo (Moyer et al., 1953). *Bacillus cereus* é resistente a determinadas concentrações de polimixina.

A solução de gema de ovo funciona como um substrato para detetar a produção de lecitinase e, além disso, a atividade da lipase. Espécies do gênero *Bacillus* sintetizam várias enzimas, como proteases e lipases, as quais podem ser intracelulares ou extracelulares, o que reforça que muitas estirpes apresentam uma atividade lipolítica extracelular elevada (Chen et al., 2004). O *B. cereus* também apresenta atividade proteolítica, sendo esta mais acentuada sobre as caseínas, comparada à atividade sobre as proteínas do soro. As estirpes produtoras de lecitinase produzem zona opaca ao redor do inóculo (Mossel et al., 1967).

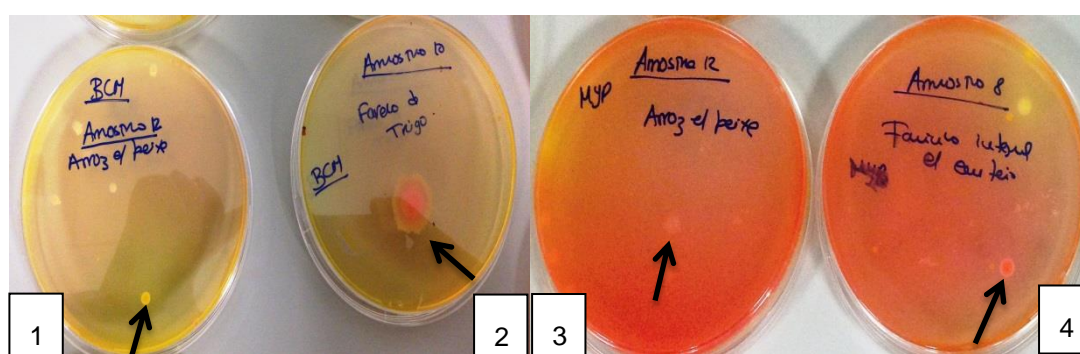
As colônias de bactérias que produzem a enzima lecitinase, hidrolisam a lecitina produzindo uma zona de opacificação ao seu redor (Figura 5.3) quando crescidas em meio de ágar contendo gema de ovo. O *Bacillus cereus* produz lecitinase e como resultado forma-se produtos insolúveis da degradação de lecitina de gema de ovo acumulando à volta das colônias de *Bacillus cereus*, formando assim um precipitado branco.



**Figura 5.3:** Colónias típicas de *B. cereus* com tonalidade rosa e forma irregular (circulo verde), formação de halo à volta da colónia devido à degradação da lecitina (circulo castanho).

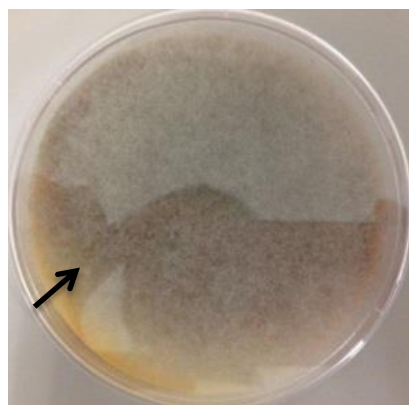
Nas amostras 2 (arroz com legumes), 4 (esparguete normal marca B), 5 (arroz branco *basmati*), 6 (arroz com espinafres), 8 (farinha integral de trigo e centeio), 10 (farelo de trigo), 11 (massa com natas e fiambre), 12 (arroz com peixe), 13 (massa com peru), 14 (esparguete com guisado) e 15 (arroz de pato) não se detetou nem enumerou nenhum microrganismo do género *Bacillus*, espécie *B. cereus*. Estes resultados foram idênticos em ambos os métodos, sendo o valor, para todas as amostras anteriormente referidas, de  $<10^2$  UFC/g de alimento.

Curiosamente em algumas amostras que não foram contaminadas, nomeadamente nas amostras 8, 10 e 12 (Figura 5.4) observou-se o crescimento de outros microrganismos que não *Bacillus cereus*. Os microrganismos foram identificados em ambas as placas, de BCM® (método ISO 7932:2004) e MYP® (método EN ISO 7932:2005), na diluição  $10^{-2}$ .



**Figura 5.4:** 1- Placa de BCM® inoculada com Amostra 12 (Arroz com peixe) após 24 horas a 30°C; 2- Placa de BCM® inoculada com Amostra 10 (Farelo de trigo) após 24 horas a 30°C; 3- Placa de MYP® inoculada com Amostra 12 (Arroz com peixe) após 24 horas a 30°C; 4- Placa de MYP® inoculada com Amostra 8 (Farelo integral com centeio) após 24 horas a 30°C; Seta preta- Crescimento de outros microrganismos que não *Bacillus cereus*.

A amostra 8 (farinha integral com centeio) destaca-se pelo interesse que a matriz tem neste estudo e também pelo crescimento de fungos filamentosos na placa de BCM® (Figura 5.5).



**Figura 5.5:** Amostra 8, farinha integral com centeio, Placa BCM, diluição  $10^{-2}$ ; Seta preta: Indicação de fungos filamentosos.

O manuseamento do material, neste caso farinha, as condições de armazenamento, o meio de transporte, entre outros é determinante para o desenvolvimento de microrganismos. No caso de ser efetuado um armazenamento incorreto mesmo depois do embalamento, os fungos como são resistentes conseguem proliferar com baixos valores de aw.

## **5.2 Resultados dos testes confirmatórios realizados durante o desenvolvimento do trabalho.**

De acordo com ambas metodologias que determinam e enumeram o *Bacillus cereus* a 30°C (ISO 7932:2004 e EN ISO 7932:2005) sempre que surgirem colónias grandes, de tonalidade rosa e rodeadas por um halo opaco, ou seja, colónias característica de *B. cereus*, são executados testes confirmatórios.

Os testes confirmatórios baseiam-se na identificação bioquímica de *Bacillus cereus* isto é, na verificação de produção de  $\beta$ -hemolisina (ISO 7932:2004 e EN ISO 7932:2005) e utilização de diferentes substratos através do teste API 50 CH® e API 20E® (ISO 7932:2004).


### **5.2.1 Teste da hemólise- Verificação de produção de $\beta$ -hemolisina:**

A verificação de produção de  $\beta$ -hemolisina é executada através do teste da hemólise. Este teste confirmatório, executado em meio de gelose de sangue ou seja meio COS (Bio-rad®), é comum nas duas metodologias e permite confirmar a presença de *Bacillus cereus* visto que esta bactéria tem atividade hemolítica.

Os testes confirmatórios foram realizados às amostras 1, 3, 7 e 9 cujo crescimento de colónias características de *B. cereus* se visualizou. Assim sendo, após se realizar o teste da hemólise nas amostras suspeitas de presença de *Bacillus cereus*, verificou-se, que a bactéria tinha atividade hemolítica (Tabela 5.2).

O *Bacillus cereus* produz três tipos de hemolisinas responsáveis pela sua atividade hemolítica as quais denominam-se de hemolisina I, hemolisina II e hemolisina III. A hemolisina I é uma citolisina inibida pelo colesterol, termolábil e é ativada pelo tiol. A hemolisina II também é termolábil no entanto não é inibida pelo colesterol e pertence à família das toxinas  $\beta$ -barril formadoras de poros (Kotiranta et al., 2000). Por fim a hemolisina III, uma proteína que provoca a lise dos eritrócitos através dos poros transmembranares (Baida & Kuzmin, 1996). É devido à produção de hemolisina III que é possível observar a zona transparente (Figura da Tabela 5.3-setas pretas) evidenciando a hemólise.

**Tabela 5.2:** Resultado obtido no teste de hemólise em placa COS® - Amostra 1, 3, 7 e 9. Seta preta: Atividade hemolítica do *Bacillus cereus* (amostra 1, 3, 7 e 9).

Amostra	Teste de Hemólise	Verificação de produção de $\beta$ -hemolisina*
1-Esparguete marca A	Positivo	
3-Arroz branco tipo agulha	Positivo	
7-Farinha de trigo tipo 55	Positivo	
9-Farinha láctea de arroz	Positivo	

\*Verifica-se a produção da  $\beta$ -hemolisina através da zona transparente formada á volta do inóculo (setas pretas).

De acordo com a metodologia a ser implementada e validada na empresa SGS, EN ISO 7932:2005, que determina e enumera o *Bacillus cereus* a 30°C, após se confirmar a atividade hemolítica presente nas amostra 1, 3, 7 e 9, concluiu-se que o *Bacillus cereus* estava presente nas amostras acima indicadas e estava ausente nas restantes amostras analisadas (2, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15).

### 5.2.2 Teste API 50 CH® e API 20E®:

Seguiu-se a metodologia, que determina e enumera o *Bacillus cereus* a 30°C, exercida na empresa SGS, ISO 7932:2004, e efetuou-se o teste confirmatório final, fermentação dos açúcares, com o API 50 CH® e API 20 E® (BioMérieux®). Os testes de fermentação foram incubados com API 50 CHL medium® e durante o período de incubação (24 e 48 horas a 30 °C) a fermentação traduziu-se por uma alteração de cor no microtubo, devido a uma produção de ácido em anaerobiose revelada pelo indicador de pH do meio. Em cada microtubo existe um açúcar diferente e o indicador de pH vermelho fenol. A metabolização dos açúcares provoca a acidificação do meio, passando a cor de vermelho a amarelo (figura 5.6). No caso da metabolização da Esculina a acidificação do meio provoca uma alteração da cor de vermelho a



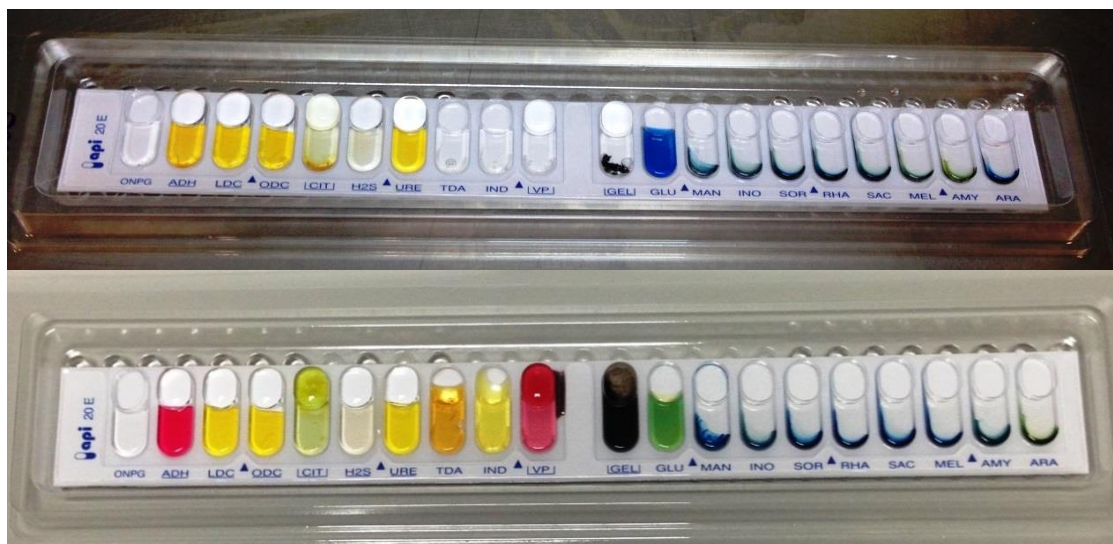
preto. Este processo bioquímico observou-se em alguns microtubos tal como se pode verificar na Figura 5.6 e no Anexo I.



**Figura 5.6:** Galeria API 50 CH® antes (lado esquerdo) de ser incubada e após 48 horas (lado direito) de incubação a 30°C. Preenchimento vermelho: teste negativo; Preenchimento amarelo e preto: Teste positivo.

Após incubação a 30°C a leitura e interpretação, da galeria API 20 E®, foi realizada após a adição de reagentes para o teste TDA, IND e VP. Para o teste do triptofano desaminase adicionou-se uma gota de reagente TDA. Para o teste do indol adicionou-se uma gota de reagente JAMES e por fim para a leitura do teste de *Voges-Proskauer* adicionou-se uma gota de reagente VP1 e uma gota de reagente VP2.

Os resultados obtidos na leitura da galeria API 20 E® estão apresentados na figura 5.7 e no Anexo II.



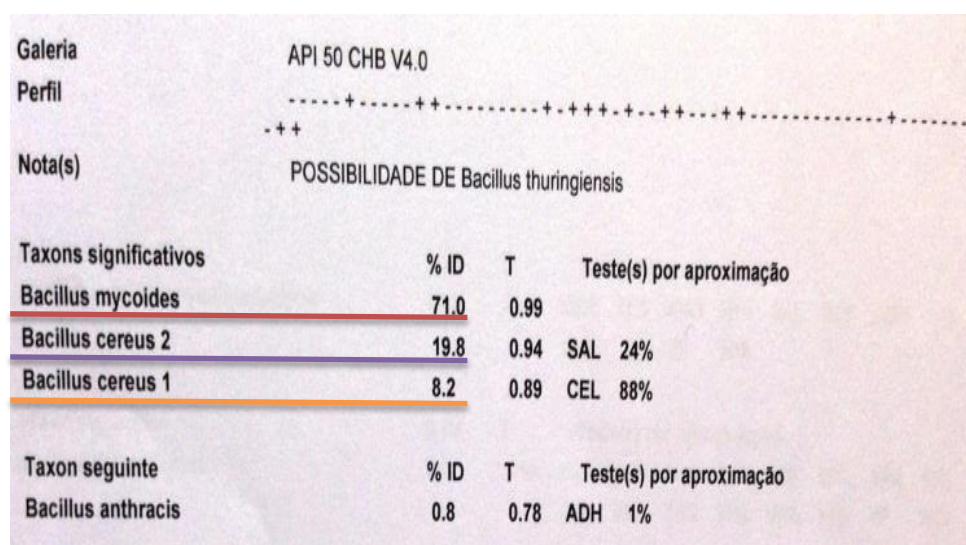
**Figura 5.7:** Galeria API 20 E® antes (figura superior) de ser incubada e após 48 horas (figura inferior) de incubação a 30 °C. Os testes positivos foram ADH-L-arginina, GEL-Gelatina (origem bovina) e GLU-D-glucose. O primeiro tubo, sem substrato serve de controle negativo.

Os dados de ambas as leituras foram idênticos para todas as amostras em confirmação (1, 3, 7 e 9) e o perfil do género foi bem identificado (Figura 5.8).

Galeria	API 50 CHB V4.0				
Perfil					
Nota(s)	POSSIBILIDADE DE <i>Bacillus thuringiensis</i>				
<b>Taxons significativos</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Teste(s) por aproximação</b>		
<i>Bacillus mycoides</i>	84.0	0.97			
<i>Bacillus cereus</i> 2	11.2	0.9	SAL	24%	
<i>Bacillus cereus</i> 1	4.5	0.85	CEL	88%	
<b>Taxon seguinte</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Teste(s) por aproximação</b>		
<i>Bacillus anthracis</i>	0.1	0.7	ADH	1%	NIT 78%

**Figura 5.8:** Resultado em percentagem do perfil da leitura das galeria API 50 CH® e API 20 E® após 24 horas. +:Teste positivo; -:Teste negativo; Linha vermelha escura: percentagem de identificação de *Bacillus mycoides*; Linha roxa: percentagem de identificação de *Bacillus cereus* 2; Linha laranja: percentagem de identificação de *Bacillus cereus* 1.





**Figura 5.9:** Resultado em porcentagem do perfil da leitura das galeria API 50 CH® e API 20 E® após 48 horas.+:Teste positivo; -:Teste negativo; Linha vermelha escura: porcentagem de identificação de *Bacillus mycoides*; Linha roxa: porcentagem de identificação de *Bacillus cereus* 2; Linha laranja: porcentagem de identificação de *Bacillus cereus* 1.

O perfil bioquímico assim constituído serve para identificação dos *Bacillus* spp. e também permite a análise taxonômica de um grupo de microrganismos nomeadamente o grupo *Bacillus cereus*. Constatou-se que o perfil bioquímico traçado para as amostras 1, 3, 7 e 9 foi idêntico.

O material de referência, pertencente ao laboratório de microbiologia da SGS, utilizado para contaminar as amostras 1, 3, 7 e 9 foi o *Bacillus cereus* ATCC 11778. Isto vai de encontro com o resultado obtido no API 50 CH® e API 20 E®, após 24 e 48 horas de incubação a 30°C. O perfil taxonômico, após 24 horas de incubação, foi de 11,2% *Bacillus cereus* 2 e 4,5 % *Bacillus cereus* 1.

A segunda leitura foi feita após 48 horas de incubação onde adveio a evidência da espécie *Bacillus cereus* 2 com 19,8% e a espécie *Bacillus cereus* 1 com 8,2% para além de *Bacillus mycoides* e a possibilidade de presença de *Bacillus thuringiensis*.

O termo não taxonômico do grupo *Bacillus cereus* é utilizado para fazer referência a um grupo de microrganismos também denominado *Bacillus cereus sensu lato*. Este grupo é composto por seis espécies: *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weihenstephanensis* (Lechner et al., 1998; Jensen et al., 2003; Bartoszewicz et al., 2008; Guinebretiere et al., 2008; Senesi & Ghelardi, 2010). Uma característica fenotípica que permite a distinção dos microrganismos deste grupo é a produção de hemólise em agar sangue. O *B. cereus sensu stricto* é fortemente hemolítico, enquanto *B. anthracis*, geralmente, não é hemolítico. *B. mycoides* tanto pode apresentar hemólise em agar sangue, como pode ser fracamente hemolítico (Lindbäck & Granum, 2000).

Os testes da hemólise executados em gelose de sangue COS® foram positivos para as amostras 1, 3, 7 e 9, como descrito anteriormente no subcapítulo 5.2.1, o que sugere que ambas as espécies, *Bacillus cereus* e *Bacillus mycoides*, do grupo *Bacillus cereus sensu lato* podem estar presentes no inóculo utilizado na contaminação das amostras. Porém, as características morfológicas esperadas em meio sólido para as colônias de *B. mycoides* foram diferentes das observadas. O crescimento rizoide é uma característica morfológica, em agar, de *B. mycoides* e *B. pseudomycoides* (Nakamura, 1998). No entanto, os resultados obtidos no API 50 CH® e API 20 E® relativamente à percentagem de *Bacillus cereus* 2 e 1 (19,8 % e 8,2% respetivamente) estão de acordo com as características morfológicas das colônias em agar.

Ao traçar o perfil bioquímico das amostras 1, 3, 7 e 9 pôde-se verificar, através da informação obtida no software apiweb: “Muito boa identificação do género”, o que significa que a identificação foi executada com êxito. De acordo com Nakamura o *B. mycoides* e *B. cereus* são bioquimicamente idênticos. A diferenciação entre estes dois microrganismos pode ser realizada com base na análise do conteúdo em ácidos gordos (Nakamura, 1998).

Segundo Logan & Berkeley todas as estirpes do grupo *B. cereus sensu lato* metabolizam a glucose e, a sua maioria, metaboliza a ribose, a D-frutose, a N-acetilglucosamina, a esculina, a maltose, a trealose, o amido e o glicogénio (Logan & Berkeley 1984). Molva e colaboradores investigaram e concluíram que as estirpes utilizadas no seu estudo (*Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis*) metabolizavam a glucose, ribose e a maltose (Molva et al., 2009). Estas referências permitem confirmar a maioria dos resultados obtidos no API 50 CH® e API 20 E® visto que os substratos metabolizados foram os seguintes:

- D-Ribose;
- D-Glucose;
- D-Fructose;
- N-Acetilglucosamina;
- Arbutina;
- Esculina-citrato de ferro;
- Salicina;
- D-Maltose;
- D-Sacarose;
- D-Trealose;
- Amido;
- Glicogénio;
- L-Arginina;
- Gelatina (origem bovina).

O grupo *B. cereus*, nomeadamente o *B. cereus* e *B. mycoides*, utiliza a glucose como fonte de carbono (mas não o manitol, a arabinose nem a xilose), hidrolisa o amido e a gelatina (com exceção das estirpes produtoras de cereulida que não utilizam o amido).

Em súmula, após a execução dos testes confirmatórios, confirmou-se a presença de *Bacillus cereus* nas amostras 1, 3, 7 e 9. Os resultados da enumeração de *Bacillus cereus* foram expressos em LOG UFC/g. Na amostra 1 enumerou-se 5,9 UFC/g em placa de BCM® e 6,0 UFC/g em placa de MYP®. J na amostra 3 o resultado em placa de BCM® e MYP® foi de 5,9 UFC/g. Os resultados obtidos na amostra 7 foram de 5,8 UFC/g e 5,9 UFC/g em placa de BCM® e MYP®, respectivamente. Por último, a amostra 9, onde foi enumerado 6,0 UFC de *Bacillus cereus* por g de alimento, em ambas as placas (BCM® e MYP®).

### 5.3 Análise estatística dos resultados:

A interpretação de dados deverá ser encaixada num resumo verbal ou numérico bem como num uso de métodos gráficos para descrever as suas principais características. O método mais apropriado depende da natureza dos dados, ou seja, dados qualitativos ou dados quantitativos. Os dados quantitativos representam informação resultante de características suscetíveis de serem medidas, apresentando-se com diferentes intensidades, que podem ser de natureza discreta (descontínua) ou contínua. Para cada característica a testar definem-se duas hipóteses: uma, designada por hipótese nula ( $H_0$ ), consiste em admitir que a ação experimental realizada com a amostra não provocou alterações nas suas características, a outra, é designada por hipótese alternativa ( $H_1$ ) (Morais, 2000).

Para validar o método implementado, foi imprescindível conceber um tratamento estatístico dos resultados obtidos neste trabalho. Para tal, utilizou-se o teste t - *Student* (Tabela 5.3) e ANOVA (Tabela 5.4) para comparar os valores dos resultados obtidos pelo método horizontal ISO 7932:2004 e pelo método horizontal EN ISO 7932:2005.

Critério de aceitação – Teste t-*Student*: Para 95% de confiança

- $t\text{-test} (15; 0,05) = 2,08$ ;
- Se  $|t\text{-stat}| < t\text{-crit}$  ou  $P > 0,05$ , aceita-se  $H_0$ ;
- $|t\text{-stat}| < t\text{-crit} \leftrightarrow 2,08 < 2,14$  logo aceita-se  $H_0$ .

$H_0$ = As contagens seguem uma distribuição normal emparelhada com o mesmo valor de mdia e variância.

De acordo com o teste efetuado t-Student estes dois conjuntos de resultados são igualmente semelhantes ao nível de confiança de 95%.

**Tabela 5.3:** Dados analíticos do t-Test: Testes para a média populacional e para a comparação de duas médias (Método 1 e método 2).

	<b>Método 1</b>	<b>Método 2</b>
<b>Média</b>	215333,3333	254000
<b>Variância</b>	1,4257E+11	1,93011E+11
<b>Nº Observações</b>	15	15
<b>Correlação Pearson</b>	0,995910252	
<b>df- Graus de liberdade</b>	14	
<b>t Estatístico</b>	-2,082845681	
<b>P(T&lt;=t) unicaudal</b>	0,0280415	
<b>t Critico unicaudal</b>	1,761310136	
<b>P(T&lt;=t) bicaudal</b>	0,056083	
<b>t Critico bicaudal</b>	2,144786688	

Preenchimento roxo: destaca o valor t estatístico; Preenchimento verde: destaca o valor t crítico; Método 1: Método ISO 7932:2004-Meio BCM®; Método 2: Método EN ISO 7932:2005-Meio MYP®.

Preenchimento roxo: destaca o valor F; Preenchimento verde: destaca o valor F crítico.

Critério de aceitação – Teste ANOVA Para 95% de confiança

- Se  $F < F_{-crit}$ , aceita-se  $H_0$ ;
- $F < F_{-crit} \leftrightarrow 0,000418 < 4,20$  logo aceita-se  $H_0$ .

$H_0$ = As contagens seguem uma distribuição normal emparelhada com o mesmo valor de média e variância.

De acordo com o teste efetuado ANOVA estes dois conjuntos de resultados são igualmente semelhantes ao nível de confiança de 95%.

**Tabela 5.4:** Análise estatística dos dados analíticos segundo ANOVA.

<b>ANOVA</b>						
<b>Fonte de Variação</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>Valor-P</b>	<b>F Critico</b>
<b>Entre Grupos</b>	0,00309108	1	0,00309108	0,0004183	0,983828	4,195972
<b>Dentro de Grupos</b>	206,927885	28	7,390281606			
<b>Total</b>	206,930976	29				

Em suma, denota-se que os testes realizados por ambos os métodos foram executados com sucesso. Comprovou-se este facto com análise estatística o que possibilita validar o método horizontal de deteção e enumeração de *Bacillus cereus* (EN ISO 7932:2005) a ser implementado na empresa.

#### 5.4 Análises de registos de análises microbiológicas a *Bacillus cereus*, na empresa SGS, desde o ano de 2006 até 2013.

Com fim de analisar e investigar a incidência do *Bacillus cereus* em Portugal, de uma forma pormenorizada e detalhada, a pedido do estagiário, a SGS facultou ao mesmo, os registos de análises microbiológicas (deteção e enumeração de *Bacillus cereus*) de 7011 amostras alimentares. As análises microbiológicas foram executadas no laboratório de microbiologia da SGS, através do método ISO 7932:2004, desde o ano de 2006 até 2013.

Pretende-se com esta investigação do historial da empresa, a análise da incidência do *Bacillus cereus* em matrizes alimentares estudadas neste trabalho, ou seja, em arroz e produtos à base de cereais. Do total de 7011 amostras alimentares (matrizes diversas) analisadas, somente foi detetado e enumerado *Bacillus cereus* em 28 amostras (Tabela 5.5) ou seja, 0,40% das amostras analisadas foram positivas.

**Tabela 5.5:** Amostras positivas de *Bacillus cereus* de um total de 7011 amostras analisadas entre o período de 2006 a 2013. Adaptado de SGS, 2014.

Amostra	Data	Descrição	Resultado UFC/g
1	02-03-2007	Farinha de Trigo T-65	$1,0 \times 10^2$
2	25-07-2007	Migas de bacalhau cozidas	$5,0 \times 10^2$
3	31-07-2007	Piri-Piri Vagem	$4,0 \times 10^2$
4	07-09-2007	Alho em pó	$1,0 \times 10^2$
5	13-11-2007	Canela moída	$1,0 \times 10^2$
6	14-11-2007	Ervas finas	$1,0 \times 10^2$
7	12-12-2007	<i>Haki Mix</i>	$1,0 \times 10^2$
8	18-06-2008	Farinha T-55	$4,0 \times 10^2$
9	30-09-2008	<i>Dreche</i>	$4,0 \times 10^2$
10	06-03-2009	Pasta vegetariana	$4,0 \times 10^2$

**Tabela 5.5:** Amostras positivas de *Bacillus cereus* de um total de 7011 amostras analisadas entre o período de 2006 a 2013 (Continuação).

Amostra	Data	Descrição	Resultado UFC/g
11	07-05-2009	Farinha trigo com fermento	2,0x10 <sup>2</sup>
12	13-05-2009	Salsa desidratada	1,0x10 <sup>2</sup>
13	29-05-2009	Hortelã lavada	2,0x10 <sup>2</sup>
14	29-06-2009	Farinha de trigo	3,0x10 <sup>2</sup>
15	12-08-2009	Pimento verde cubos	6,0x10 <sup>2</sup>
16	20-08-2009	Arroz	5,0x10 <sup>2</sup>
17	08-10-2009	Delícias do mar	1,0x10 <sup>2</sup>
18	22-10-2009	Alface frisada	5,0x10 <sup>2</sup>
19	22-04-2010	Salada de alface	1,0x10 <sup>2</sup>
20	22-04-2010	Salada de alface	1,0x10 <sup>2</sup>
21	22-04-2010	Salada de alface	2,0x10 <sup>2</sup>
22	30-10-2012	Sopa creme espargos	4,0x10 <sup>2</sup>
23	05-04-2013	Bola de berlim chocolate	1,0x10 <sup>2</sup>
24	11-04-2013	Sandes de frango fatiado	2,1x10 <sup>2</sup>
25	11-07-2013	Bolo chocolate	2,0x10 <sup>2</sup>
26	09-08-2013	Lasanha	2,0x10 <sup>2</sup>
27	23-08-2013	<i>Baguette Rustic</i>	1,0x10 <sup>2</sup>
28	17-10-2013	Creme	5,0x10 <sup>2</sup>

Sombreado rosa claro: sublinha os produtos á base de cereais; sombreado rosa-avermelhado: destaca o Arroz.

Das 28 amostras detetadas com *Bacillus cereus*, dez eram amostras alimentares de produtos à base de cereais (amostra 1 -farinha de Trigo T-65, amostra 8-farinha T-55, amostra 9-*dreche*, amostra 11-farinha trigo com fermento, amostra 14-farinha de trigo, amostra 23-bola de berlim chocolate, amostra 24-sandes de frango fatiado, amostra 25-bolo chocolate, amostra 26-lasanha, amostra 27-*baguette Rustic*) e uma amostra alimentar era arroz (amostra 16-arroz).

Segundo Dufrenne o *Bacillus cereus* encontra-se amplamente distribuído na natureza, tendo já sido isolado do solo, pó, colheitas de cereais, vegetação, pêlos de animais, água e matéria em decomposição. Portanto, o microrganismo é encontrado numa grande variedade de produtos agrícolas de origem vegetal e animal. Os alimentos são contaminados por *Bacillus cereus* durante o manuseio, processamento ou distribuição, podendo o microrganismo crescer e ser o responsável pela ocorrência de doenças de origem alimentar (Dufrenne et al., 1994).

Analisando as 28 amostras quanto à matriz propriamente dita, verifica-se que 10 amostras (Amostra 1 -farinha de Trigo T-65, amostra 8-farinha T-55, amostra 9-*dreche*, amostra 11-farinha trigo com fermento, amostra 14-farinha de trigo, amostra 23-bola de berlim chocolate, amostra 24-sandes de frango fatiado, amostra 25-bolo chocolate, amostra 26-lasanha, amostra 27-*baguette Rustic*) são matrizes à base de cereais, o que segundo Bastoszewicz e colaboradores estão entre os alimentos mais frequentemente contaminados por *Bacillus cereus* (cereais, leite cru, leite processado termicamente) (Bastoszewicz et al., 2008).

Segundo Chen e colaboradores os alimentos desidratados e especiarias estão associados ao agente etiológico *B. cereus* (Chen et al., 2001). Das 28 matrizes positivas, quatro são alimentos desidratados incluindo especiarias (amostra 4-alho em pó, amostra 5-canela moída, amostra 12-salsa desidratada e amostra 7-*Haki Mix*).

Os vegetais prontos a consumir são relatados por vários investigadores como sendo alimentos fortemente ligados à contaminação por *Bacillus cereus* (Arribas et al., 1988; Ouoba, et al., 2008). A amostra 6-ervas finas, amostra 10-pasta vegetariana, amostra 13-hortelã lavada, amostra 15-pimento verde cubos, amostra 18-alface frisada, amostra 19-salada de alface, amostra 20-salada de alface e amostra 21-salada de alface são produtos vegetais prontos a consumir, representando 28,6% das amostras positivas analisadas

A ampla distribuição do microrganismo e a sua capacidade de produzir esporos resistentes a condições de secura e a temperaturas elevadas propicia a que os alimentos prontos a serem consumidos possam conter *Bacillus cereus* pelo que requerem medidas de controlo que previnam o seu crescimento, especialmente depois de cozinhados (como exemplo a sopa), quando toda a flora competitiva foi eliminada (Rhodehamel & Harmon, 1995). Denota-se a amostra 22-Sopa creme espargos para realçar esta referência.

O arroz (amostra 16), é considerado uma grande fonte de contaminação de *Bacillus cereus*, nomeadamente o arroz cozido ou frito (Cronin et al., 2009). A frequência de isolamento

de *B. cereus* no arroz é de 40% a 100% (Franco & Landgraf, 1996). No entanto, este microrganismo tem um reservatório natural (o solo) e, devido à resistência dos seus esporos, o *B. cereus* pode ser isolado em qualquer tipo de ambiente, estando amplamente distribuído na natureza (Ghelardi et al., 2002).

Alguns alimentos envolvidos nas toxinfecções por *Bacillus cereus* foram notificados pelo RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed), desde 2005, tal como o cacau, o leite UHT, as massas semi-frescas, a mistura de especiarias e o peixe. Dentro das 28 amostras destacam-se as amostras 2-migas de bacalhau cozidas e 17-delícias do mar, produtos à base de peixe conforme notificado pelo RASFF (Veiga et al., 2009).

Analisando as 11 amostras positivas de produtos à base de cereais que representam 39,3%, pode-se verificar, que estas foram detetadas entre os meses de março a setembro, sendo o mês de agosto aquele em que se detetou um maior número de amostras positivas (amostra 16-arroz, amostra 26-lasanha e amostra 27- *baguete rustic*). Constatou-se que a incidência de *B. cereus* nestas amostras centra-se na primavera e no verão. No mês de abril obteve-se duas amostras positivas (amostra 23- bola de berlim chocolate e amostras 24-sandes de frango fatiado) já no mês de maio somente a farinha de trigo com fermento (amostra 11) foi observada. No mês de junho registaram-se duas amostras positivas de produtos à base de cereais, a farinha de trigo (amostra 14) e farinha T-55 (amostra 8). No mês de julho e setembro o bolo de chocolate (amostra 25) e *dreche* (amostra 9) foram as amostras positivas, respetivamente.

Como referido neste trabalho existem vários fatores que podem contribuir para o crescimento e desenvolvimento deste microrganismo. O *B. cereus* tem uma temperatura ótima de crescimento entre 30 e 40 °C, podendo a temperatura máxima de crescimento atingir os 55 °C. Estas temperaturas são atingíveis no verão o que promove a incidência de *B. cereus* nesta época do ano (Svensson et al., 2004; Vissers et al., 2007; Bartoszewicz et al., 2008). Azambuja sugere, após estudos experimentais efetuados, que a predominância do agente etiológico *B. cereus* foi mais acentuada no período de verão com valores médios de temperatura do ar de 26 °C, humidade relativa de 66% e temperatura do solo de 24,7 °C (Azambuja, 2006). Em Portugal, na primavera, é possível encontrar estes valores de temperaturas e humidade.

Martins e colaborador demonstraram que *B. cereus* faz parte da flora fecal de indivíduos normais, havendo algumas indicações que a sua presença é mais comum nos meses de verão, e é dependente dos hábitos alimentares (Martins & Martins 2013).

Os valores guia compõem linhas de orientação para avaliação da qualidade microbiológica dos produtos. Permitem identificar situações que requerem monitorização, com o objetivo de garantir o cumprimento das boas práticas de fabrico.

A presença de uma grande quantidade de *Bacillus cereus* ( $\geq 10^6$ ) no alimento é indicativo de crescimento e proliferação do organismo o que torna um potencial perigo para a saúde. A dose infecciosa de *B. cereus* situa-se nas  $10^5$ - $10^8$  células ou esporos, no entanto, contagens de



$10^3$  UFC/g foram encontradas em alimentos causadores de toxinfecção alimentar (Arnesen et al., 2008).

Analisando os resultados expressos em UFC/g de alimentos é possível denotar que os valores obtidos variam entre  $1 \times 10^2$  e  $6 \times 10^2$  UFC/g de alimento. Conclui-se então que de acordo com os valores guia os resultados obtidos entre 2006 e 2013 estão no nível satisfatório (Tabela 5.7) ou seja, os resultados analíticos indicam uma boa qualidade microbiológica.

**Tabela 5.6:** Valores guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração (adaptado de: INSA,2005).

Microrganismo	Grupo de alimentos*	Qualidade microbiológica (UFC/g quando não indicado)			
		Satisfatório	Aceitável	Não Satisfatório	Inaceitável / potencialmente perigoso
<i>Bacillus cereus</i>	1,2 e 3	$\geq 10^2$	$\geq 10^2 \leq 10^3$	$> 10^3 < 10^5$	$\geq 10^5$

\*No **Grupo 1** – Refeições, sandes, bolos ou sobremesas doces com ingredientes totalmente cozinhados, ou adicionados de especiarias, ervas aromáticas secas ou desidratadas ou tratadas por radiação ionizante, de produtos UHT (*ultra-high temperature*) e de maionese industrializada; **Grupo 2** - Refeições, sandes, bolos ou sobremesas doces cozinhados adicionadas de ingredientes crus e /ou com flora específica própria (exemplos: saladas frias, pratos de carne ou peixe com saladas cruas, etc.) e por fim o **Grupo 3** – Saladas, vegetais e frutos crus.

A maioria das vítimas de uma infeção alimentar não recorre a um profissional de saúde e, quando o faz, raramente é sujeita a análises que permitam identificar o agente responsável. Por outro lado, apenas algumas doenças de origem alimentar são de declaração obrigatória. Uma das causas que pode contribuir para que o peso de *Bacillus cereus* como agente patogénico alimentar seja desconsiderado é o diagnóstico não adequado, uma vez que a doença causada por este agente pode ser confundida com outro tipo de toxinfecção alimentar. A ASAE assegura que os dados relativos às doenças de origem alimentar em Portugal são raros, o que se transpõe numa incorreta perceção da importância relativa de cada uma das doenças, como é o caso das que tem origem em *Bacillus cereus* (Veiga et al.,2009).

No subcapítulo **2.3.1** abordou-se casos a nível nacional de alimentos contaminados com *Bacillus cereus*. De facto pode-se relacionar alguns dos casos descritos com os dados adquiridos na SGS, e que estão relacionados com a matriz em estudo (arroz e produtos à base de cereais). Em 2008 o INSA reportou que dos 81 surtos diagnosticados, os que envolveram o *Bacillus* spp. foram os responsáveis pelo maior número de hospitalizações. Sendo que os géneros alimentícios que estiveram envolvidos foram as bifanas (cujo número elevado de

*Bacillus cereus* foi de  $6,0 \times 10^4$  UFC/g), o peixe assado com puré e o frango estufado com arroz (Correia et al., 2013).

A 16 de Abril de 2009, cooperantes da Direção de Avaliação e Comunicação dos Riscos, pertencente à Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, definiram alguns géneros alimentícios aos quais, nos últimos três anos, esteve associada, em Portugal, a presença de agentes biológicos patogénicos. Um dos géneros alimentícios, arroz de pato, apresentou diversos agentes patogénicos entre os quais o *Bacillus cereus* (Veiga et al., 2009).

O estudo desenvolvido por Carvalho e colaboradores do Departamento de Tecnologia Alimentar, Biotecnologia e Nutrição do Instituto Politécnico de Santarém, Escola Superior Agrária e Departamento de Controlo Alimentar do Laboratório de Medicina Veterinária decorreu entre o mês de fevereiro e abril do ano de 2013 e envolveu 1070 amostras das quais 675 eram produtos de pastelaria sem creme e 395 produtos de pastelaria com creme. De acordo com os critérios microbiológicos estabelecidos pelo INSA averiguou-se que mais de 95% destes produtos apresentaram níveis inferiores ao valor máximo de referência relativamente a *Bacillus cereus*. Os produtos que apresentaram níveis superiores, pertenciam, na sua maioria, ao grupo dos produtos de pastelaria com creme (Carvalho et al., 2014).

Os casos acima descritos foram alguns dos casos onde se verificou que a matriz em estudo estava implícita nas infeções causadas pelo *Bacillus cereus*.

### **5.5 Ensaio Interlaboratorial:**

Aos laboratórios oficiais é recomendado que realizem as análises microbiológicas alimentares utilizando métodos reconhecidos internacionalmente. Além disso, os métodos ou procedimentos internos devem ser submetidos a controlo interno e externo (Koch et al., 2011).

Os laboratórios devem participar regularmente em ensaios de aptidão relacionados com o âmbito da sua acreditação, dando preferência aos programas de ensaio de aptidão que utilizem matrizes apropriadas. O laboratório deve evidenciar participação anual com resultados satisfatórios por parâmetro, método e matriz. O laboratório deve estabelecer os critérios de aceitação para os resultados das participações anuais em ensaios de aptidão (IPAC, n.d.).

Para atingir esses objetivos, é necessário o uso de elementos de referência, materiais de referência (MR). A rastreabilidade é um aspeto essencial da garantia da qualidade para se obter aceitação internacional de dados analíticos (Moura, 2009). Segundo o IPAC um material de referência é uma estirpe de referência com uma ou mais propriedades certificadas por um processo tecnicamente válido.

Em Portugal o Instituto Português da Qualidade (IPQ) considera a participação dos laboratórios acreditados (ou candidatos) em ensaios de aptidão ou outros exercícios de

comparação interlaboratorial como um mecanismo importante para avaliar a respetiva competência técnica e para monitorizar a integridade dos resultados dos seus ensaios e calibrações. Desta forma, é obrigatória a participação dos laboratórios em ensaios de aptidão ou outros exercícios de comparação interlaboratorial para a totalidade do âmbito acreditado ou a acreditar. O incumprimento deste requisito só é aceite se for demonstrada a inexistência de exercícios a nível nacional ou internacional ([www.ipg.pt/](http://www.ipg.pt/)).

Durante o estágio, o estagiário teve a oportunidade de acompanhar todo o processo de um ensaio interlaboratorial em que a empresa SGS participou, e cuja análise era a deteção e enumeração de *Bacillus cereus*.

O cumprimento dos requisitos da norma de referência é da inteira responsabilidade das entidades acreditadas ou candidatas à acreditação. O método horizontal que a empresa SGS utiliza para a deteção e enumeração de *Bacillus cereus*, em produtos alimentares, é seguido pela norma ISO 7932:2004. O meio utilizado pela empresa, para a enumeração de *Bacillus cereus*, é o meio BCM (*Bacillus cereus Medium*). O método a ser implementado e validado, na empresa SGS, para deteção de *Bacillus cereus* é executado com o meio MYP-Mossel da Bio-rad®. O ensaio foi executado de acordo com a ISO 7932:2004 utilizando assim o meio BCM® em paralelo com a EN ISO 7932:2005 (meio MYP®).

O procedimento de ambos os métodos, preparação das amostras e incubação das suspensões iniciais e respetivas diluições sucessivas estão referenciados no subcapítulo 4.1.2.

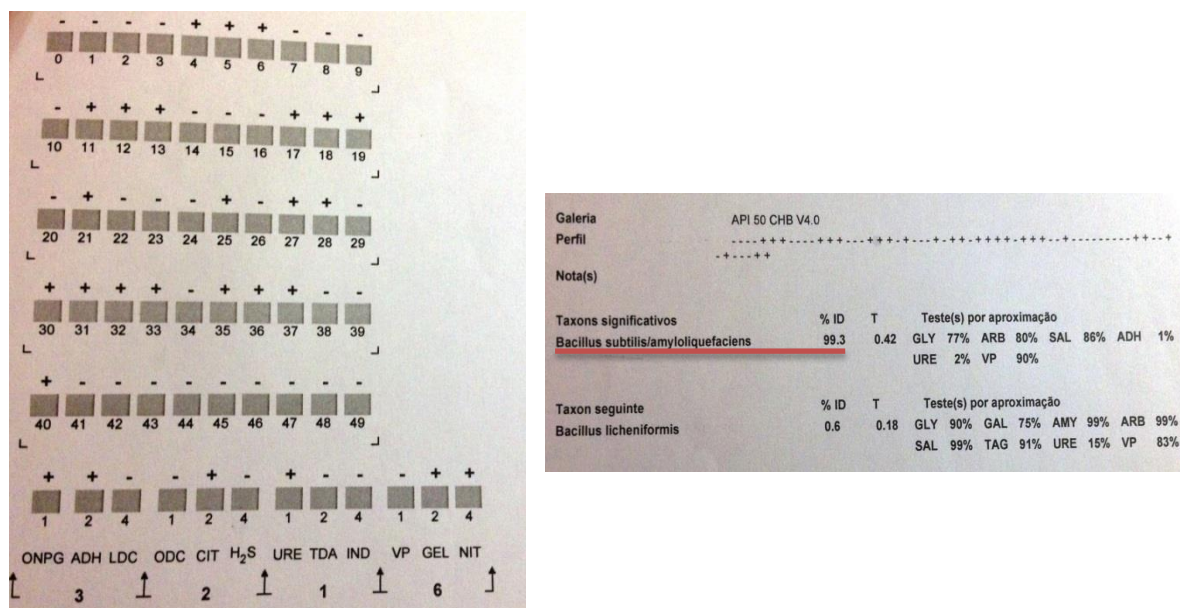
#### **5.5.1 Resultados do ensaio interlaboratorial:**

Após 24 horas de incubação a 30°C de ambas as placas (BCM® e MYP®) observou-se, nas placas de MYP®, o crescimento de colónias de tonalidade rosa claro. Algumas das colónias observadas apresentavam um ligeiro halo, outras não tinham halo formado. Na placa de BCM® observou-se colónias de tonalidade amarela, sem formação de halo, e colónias de tonalidade rosa clara. Seguidamente, procedeu-se à execução dos testes confirmatórios, o teste de hemólise e o teste de utilização de diferentes substratos.

O procedimento dos testes confirmatórios está descrito no subcapítulo 4.1.5. O teste da hemólise foi executado a partir das colónias rosa com halo formado (halo muito reduzido e irregular) com fim de confirmar as colónias suspeitas de *Bacillus cereus*. O teste da hemólise foi de difícil interpretação pois não se visualizou de forma clara a produção de  $\beta$ -hemolisina. O teste de confirmação foi prosseguido com o teste API 50 CH® e API 20E®.

Após 24 horas de incubação a 37°C fez-se a primeira leitura através do *software apiweb*. No entanto somente após 48 horas de incubação o perfil bioquímico foi delineado com

sucesso, acusando presença de *Bacillus subtilis* 99,3% (Figura 5.10), sem qualquer % de *Bacillus cereus*, ou seja, a análise foi negativa para este agente etiológico.



**Figura 5.10:** Resultado da utilização de diferentes substratos da galeria API 50 CH® (microtubos 0-49) e API 20 E® (microtubos ONPG,ADH,LDC,ODC,CIT,H<sub>2</sub>S,URE,TDA,IND,VP,GEL,NIT) após 48 horas (imagem à esquerda); Resultado em percentagem do perfil da leitura das galeria API 50 CH® e API 20 E® após 48 horas (imagem à direita). +:Teste positivo; -:Teste negativo Linha vermelha escura: percentagem de identificação de *Bacillus subtilis* (Imagem à direita).

Os resultados da participação nos ensaios de aptidão e nos exercícios de comparação interlaboratorial, complementam outra informação recolhida nas auditorias, pelo que o desempenho da entidade nestas ações é tido em consideração.

Segundo o Guia para controlo de qualidade em laboratórios de microbiologia redigido pelo IPAC para validar/ implementar um método é imprescindível a evidência de participação em pelo menos um ensaio interlaboratorial com resultado satisfatório.

Em súmula, o resultado obtido neste ensaio interlaboratorial (análise microbiológica de contagem de *Bacillus cereus*) foi bem-sucedido pois foi concordante com o resultado esperado revelado pelo laboratório externo responsável pelo ensaio interlaboratorial. Deste modo, em conclusão, o método tem todos os parâmetros adequados para ser validado na empresa.

## 6. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS:

Atualmente há um grande interesse da comunidade científica em investigar o agente etiológico *Bacillus cereus*. Ultimamente este microrganismo tem sido alvo de investigações permanentes no campo da microbiologia alimentar, envolvendo estudos de bioquímica e genética molecular.

O *Bacillus cereus* é um microrganismo globalmente conhecido pela sua capacidade de causar síndrome diarreica e síndrome emética. Aliando a elevada incidência de estirpes potencialmente patogénicas à grande capacidade de resistência destes microrganismos, através da produção de esporos termorresistentes e, considerando que a dose infetante de *B. cereus* é de  $10^5$ - $10^8$  bactérias sendo que a grande parte das estirpes são mesófilas, considera-se relevante preservar os alimentos a temperaturas inferiores a 4 °C e superiores a 65°C impedindo assim a germinação dos esporos e o crescimento bacteriano.

Assim, de acordo com as especificidades do microrganismo em estudo, foi possível implementar um método horizontal na empresa SGS que permite detetar e enumerar *Bacillus cereus* a 30 °C em várias matrizes alimentares, em particular no arroz e produtos à base de cereais. O método implementado EN ISO 7932:2005 permitiu a contagem de *Bacillus cereus* em placa MYP® e, de forma a validar o método, a técnica foi executada em paralelo com o método ISO 7932:2004 usado atualmente na empresa para detetar e enumerar *Bacillus cereus* em placa BCM®. Os resultados foram concordantes por ambos os métodos e a nível estatístico os resultados foram satisfatórios o que permite validar o método implementado.

Em suma, a análise de alimentos formados por vários ingredientes torna complexa a associação da presença do microrganismo em estudo com um ingrediente específico, uma vez que, o *B. cereus* produz esporos, pelo que pode ser detetado numa vasta diversidade de alimentos. Deste modo, considero que seria importante num estudo futuro analisar segundo a mesma metodologia os ingredientes que compõe esses alimentos, por exemplo só arroz ou só massa.

Para melhorar este estudo seria indispensável também uma análise mais pormenorizada para se poder correlacionar a presença de um gene específico (que codifica uma enterotoxina) com um alimento, ambiente ou genótipo característico e a produção das enterotoxinas.



## 7. BIBLIOGRAFIA:

- Adams, M. A. & Moss, M. (2000) *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Food microbiology, Bodmin, UK: MPG Books Ltd. p: 187–192.
- Agata, N., Ohta, M. M. & M. Isobe (1995) A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters, 129: 17– 20.
- Agata, N., Ohta, M. & Yokoyama, K. (2002) Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. International Journal of Food Microbiology, 73: 23-7.
- Akiyama, N., Mitani K., Tanaka Y., Hanazono, Y., Motoi, N., Zarkovic, M., Tange, Y., Hirai, H. & Yazaki, Y. (1997) Fulminant septicemic syndrome of *Bacillus cereus* in a leukemic patient. The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology, 36: 221– 226.
- ANPOC - Associação Nacional de Produtores de Cereais, Oleaginosas e Proteaginosas, (2011) “A Importância do Interprofissionalismo na Organização das Fileiras”, ENMP, Elvas, p: 1-27.
- Arnesen, L. P. S., Fagerlund, A., & Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Review, p: 1-28.
- Arribas, M.L. G., Plaza, C. J., De La Rosa, M. C. & Mosso, M. A. (1988) Characterization of *B. cereus* strains isolated from drugs and evaluation of their toxins. Journal of Applied Bacteriology, 64: 257-264.
- Azambuja, A. O. (2006). Ecologia de *Bacillus spp.* em solos orizícolas e o impacto dos tratamentos fitossanitários. Dissertação de Mestrado em Biologia: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo: UNISINOS, p: 66.
- Azanza, P.V. & Centeno E.D.E. (2004): Inactivation of *Bacillus cereus* spores during rice cooking. Food Science and Technology Research, 10: 161–163.
- Azeredo, R.M.C. (1998) Estimativa de riscos relacionados à contaminação de preparações de arroz por *Bacillus cereus*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
- Baat, C.A. (1999) *Bacillus cereus*. In Encyclopedia of Food Microbiol ed. Robinson, J.P., Batt, C.A. and Patel, P.D. New York: Academic Press, p: 119–124.
- Baida, G.E. & Kuzmin N.P. (1996) Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus* Biochimica et Biophysica acta, 1284: 122-124.
- Balardin, R.S. & Borin, R.C. (2001) Doenças na cultura do arroz irrigado. Santa Maria, UFSM: 01-48.
- Bantados, B., Grein, J. & Ewing, A. (2013) *B. cereus* bacteremia in an IV drug abusing patient. Clinical Vignette, Proceedings of UCLA Healthcare, 17: 1-4.
- Banwart, G.J. (1989) Basic food microbiology, AVI-Van Nostrand Reinhold, New York, NY.

- Baptista, P. & Saraiva, J. (2003), Higiene Pessoal na Indústria Alimentar, Forvisão, Guimarães: 1-46.
- Bartoszewicz, M., Hansen, B.M. & Swiecicka, I. (2008) The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. Food Microbiology, 25(4): 588-596.
- Becker, H., Shaller, G., Von Wiese, W. & Terplan, G. (1994) *Bacillus cereus* in infant foods and dried milp powders. Internacional Journal of Food Microbiology, 69: 237-246.
- Beecher, D.J. & Wong, A.C.L. (1994) Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor Infection and Immunity, 62(3): 980-986.
- Bennett, R. W. (1992) Staphylococcal Enterotoxins. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association; Washington, p: 533-547.
- Bottone, E.J. (2010) *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. Clinical Microbiology, 23(2): 382-98.
- Borge, G. I. A., Skeie, M., Sorhaug, T., Langsrud, T. & Granum, P. E. (2001) Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. International Journal of Food Microbiology, 69: 237-246.
- Bhunia, A.K. (2008) Foodborne microbial pathogens – mechanisms and pathogenesis. West Lafayette: Springer: p: 135-149.
- Budavari, S. (1996) The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, 12th ed.,p: 165.
- Callegan, M. C., Booth M. C., Jett B. D. & Gilmore M. S. (1999) Pathogenesis of Gram-positive bacterial endophthalmitis. Infection and Immunity, 67: 3348–3356.
- Candrian, U. (1995) Polymerase chain reaction in food microbiology. Journal of Microbiological Methods, 23 (1):89-103.
- Camara, S.A.V. (2002) Surtos de toxinfecções alimentares no Estado de Mato Grosso do Sul, no período de 1998 – 2001. Monografia (Curso de Especialização de Gestão em Saúde) - Escola de Saúde Publica “Dr. Jorge David Nasser”, Campo Grande – MS.
- Carlin, F., Brillard, J., Broussolle, V., Clavel, T., Duport, C., Jobin, M., Guinebretière, M.H., Auger, S., Sorokine, A. & Nguyen-thé, C. (2010) Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. Food Research International, 43(7): 1885-1894.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (1994) Epidemiologic notes and reports *Bacillus cereus* food poisoning associated with fried rice at two child day care centers-Virginia, 43:177-178.
- Chen, C.H., Ding, H.C. & Chang T.C. (2001) Rapid identification of *Bacillus cereus* based on the detection of a 28, 5 Kilodalton cell surface antigen. Journal of Food Protection, 64 (3): 348-354.



- Chen, L., Coolbear, T. & Daniel, R.M. (2004) Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus spp* isolated from milk powder production lines. International Dairy Journal, 4: 495-504.
- Claus, D. & Berkeley, R.C. (1986) Genus *Bacillus*. In: Holt, J.G. editor-in-chief. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. 9. Ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 2, p: 1105-1139.
- Colak, H., Hampikyan, H., Bingol, E.B., Cetin, O., Akhan, M. & Turgay. S.I. (2012) Determination of Mould and Aflatoxin Contamination in Tarhana, a Turkish Fermented Food The Scientific World Journal, p: 1-6.
- Colpin, G. G. D., Guiot, H. F. L., Simonis, R. F. A. & Zwann E. E. (1981) *Bacillus cereus* meningitis in a patient under gnotobiotic care. The Lancet, 318(2): 694–695.
- Correia, C.B., Cunha, I.C., Coelho, A.S., Maia, C., Pena, C., Bonito, C.C., Sousa, I., Toscano, M.M., Furtado, R., Santos, S.D., Viegas, S., Lopes, T.T., Saraiva, M. & Calhau, M.A. (2013) Investigação laboratorial de toxinfecções alimentares. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 1:1-3.
- Cronin, U. P. & Wilkinson, M. G. (2009) The growth, physiology and toxigenic potential of *Bacillus cereus* in cooked rice during storage temperature abuse. Food Control, 20: 822-828.
- Dias, M.F.P. & Rocha, A.M.C.N. (2012) Evolução das estratégias de investigação do arroz no INIA- Portugal. Revista de Ciências Agrárias, 7: 69-87.
- Didelot, X., Barker, M., Falush, D. & Priest, F.G. (2009) Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. Systematic and Applied Microbiology, 32(2): 81-90.
- Dohmae, S., Okubo T., Higuchi W., Takano T., Isobe H., Baranovich T., Kobayashi S., Uchiyama M., Tanabe T., Itoh M. & Yamamoto T. (2008) *Bacillus cereus* nosocomial infection from reused towel. Journal of Hospital Infection, 69(4): 361-7.
- Drobniewski, F.A. (1993) *Bacillus cereus* and related species. Clinical Microbiology Reviews, 6(4): 324-338.
- Dufrenne, J., Bijwaard, M., Giffel, M., Beumer, R. & Notermans, S. (1995) Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. International Journal of Food Microbiology, 27(2): 175-183.
- Dufrenne, J., Soentoro, P., Tatini, S., Day, T. & Notermans, S. (1994) Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food production. International Journal of Food Microbiology, 23(1): 99-109.
- EFSA (2006), the EFSA Journal, European Food Safety Authority. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, and antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union is in Japan. Journal of Hospital Infection, 69: 361–367.
- EFSA (2011), the EFSA Journal, European Food Safety Authority. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009.

- EFSA (2012), the EFSA Journal, European Food Safety Authority. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M. & Scherer. (2004) *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 48: 479-487
- Ehling-Schulz, M., Guinebretière, M.-H., Monthán, A., Berge, O., Fricker, M. & Svensson, B. (2006). Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 260: 232-240.
- El Saleeby, C. M., Howard S. C., Hayden R. T. & McCullers J. A. (2004) Association between tea ingestion and invasive *Bacillus cereus* infection among children with cancer. Clinical Infectious Diseases, 39: 1536–1539.
- El-Khawas, H. & Adachi, K. (1999) Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. Biology and Fertility of Soils, 28: 377-381.
- EN ISO 7932 (2005) Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* – Colony-count technique at 30 °C.
- Ferreira, J.J. (2001) A série ISO 9000:2000. São Paulo: Fundação Vanzolini.
- Ferreira, N.C., Nascimento, E.M., Figueiredo, R.M.& Queiroz, A.J. (2004) Microbiologia de farinhas de mandioca durante o armazenamento. Ciência Rural, 34(2): 551-555.
- Finlay, W.J.J., Logan, N.A. & Sutherland, A.D. (2002) *Bacillus cereus* emetic toxin production in relation to dissolved oxygen tension and sporulation. Food Microbiology, 19: 423-430.
- Franco, G. M. B. & Landgraf, M. (1996) Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Editora Atheneu, p: 33-81.
- Forsythe, S.J. (2002) Microbiologia da Segurança Alimentar. Artmed, Porto Alegre, Brasil, p:107,176,177,178, 262.
- Forsythe, S. J. (2005) *Enterobacter sakazakii* and other bacteria in powdered infant milk formula. Maternal and Child Nutrition, 1: 44-50.
- Funada, H., Votani C., Machi T., Matsuda T. & Nonomura A.(1988) *Bacillus cereus* bacteremia in an adult with acute leukemia. Japanese Journal of Clinical Oncology, 18: 69-74.
- Furtado, R., Correia, C.B., Alvito, P. (2013) Contaminantes de origem microbiológica em alimentação infantil. Instituto Nacional Doutor Ricardo Jorge, 2: 06-07.
- Gandra, E.A., Gandra, T.K.V., Mello, W.S. & Godoil, H.S. (2008) Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. Acta Scientiarum, Technology, 30 (1): 109-118.
- Ghelardi E., Celandroni F., Salvetti S. (2002) Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food poisoning outbreaks. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 208: 129–134

- Goepfert, J.M., Spira, W.M., Kim, H.U. (1972) *Bacillus cereus*: food poisoning organism. A Review of Journal of Milk and Food Technology, 35: 213–227.
- Granum, P. E. (1994) *Bacillus cereus* and its toxins. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement, 76: 61S-46S.
- Granum, P. E. & Lund, T. (1997) *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letter, 157: 223-228.
- Granum, P.E., Brynestad, S. & Kramer, J.M. (1993) Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. International Journal of Food Microbiology, 17: 269–279
- Guinebrètière, M.H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling, S. M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen, C., Heyndrickx, M. & Devos, P. (2008) Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. Environmental Microbiology, 10(4): 851-865.
- Harmon, S.M., Goepfert, J.M. & Bennett R.W. (1992) *Bacillus cereus*. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3<sup>rd</sup>ed. American Public Health Association, p: 593-604.
- Hauge, S. (1955) Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli. Journal of Applied Bacteriology, 18: 591-595.
- Hendriksen, N.B, Hansen, B.M. & Johansen, J.E (2006) Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam. Antonie van Leeuwenhoek, 89(2): 239-249.
- Hilliard, N. J., Schelonka, R. L. & Waites, K. B. (2003) *Bacillus cereus* bacteremia in a preterm neonate. Journal of Clinical Microbiology, 41(7): 3441-3444.
- Houška, M., Kýhos, K., Landfeld, A., Průch, J., Uhařová, H.; Šp elina, V., Novotná, P. (2007) Dry Heat Inactivation of *Bacillus cereus* in Rice. Department of Food Engineering, Food Research Institute Prague, 25: 208-213
- ICMSF (1996) *Bacillus cereus*. Microorganisms in Foods. Microbiological Specifications of Food Pathogens. London, Blackie Academic & Professional, p: 20-35.
- INSA (2005), Valores guia para a avaliação da qualidade dos alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração, Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge, Lisboa.
- INE, I.P (2013) Instituto Nacional de Estatísticas, Estatísticas Agrícolas, Lisboa, Portugal. p: 19, 25, 71, 73, 82, 94.
- ISO 7932:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* – Colony-count technique at 30 °C.
- ISO 6887-1:1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
- IPAC (s.d.) Guia para controlo de qualidade em laboratórios de microbiologia, p: 1-8.

- Jackson, S.G. (1993) Rapid screening test for enterotoxin-producing *Bacillus cereus*. Journal of Clinical Microbiology, 31(4): 972-974.
- Jay, J.M., Loessner, M.J. & Golden, D.A. (2005) *Bacillus cereus* gastroenteritis, Modern Food Microbiology, 7th Ed. Springer Science + Business Media, Inc., New York, USA, p: 583-590.
- Jensen, G.B., Hansen, B.M., Eilenberg, J. & Mahillon, J. (2003) The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. Environmental Microbiology, 5(8): 631-640.
- Jouve, J.L., Stringer, M.F. & Baird-Parker, A.C. (1998) Food Safety Management Tools. ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force, Brussels, p: 1-23.
- Kennedy, G. & Burlingame, B. (2003) Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective. Food Chemistry, Barking, 80(4): 589-596.
- Kramer, J.M. & Gilbert, R.J. (1989) *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species M.P. Doyle (Ed.), Foodborne bacterial pathogens, Marcel Dekker, New York and Basel p: 21-64.
- Khodr, M., Hill, S. & Perkins, L. (1994) *Bacillus cereus* food poisoning associated with fried rice at two child day care centers - Virginia, 1993. Morbidity and Mortality Weekly Report, 43(10): 177-17.
- Koch M, Bremser W, Köppen R, Krüger R, Rasenko T, Siegel D, et al. (2011) Certification of reference materials for ochratoxin A analysis in coffee and wine. Accreditation and Quality Assurance, 16(8-9): 429-37.
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K. & Haapasalo, M. (2000) Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. Microbes and Infection, 2: 189-198.
- Lacasse, D. (1995) Introdução à Microbiologia Alimentar. Instituto Piaget, Lisboa, p: 421-424.
- Lake R., Hudson A., Cressey P. (2004): Risk profile: *Bacillus* spp. in rice. Institute of Environmental Science and Research, New Zealand.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K.P., Prub, B.M., Kaplan, T., Wiebnergunkel, E., Stewart, G.S.A.B. & Scerer, S. (1998) *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. International Journal of Systematic Bacteriology, 48(4): 1373-1382.
- Lindback, T., & Granum, P. E. (2006) Detection and purification of *Bacillus cereus* enterotoxins. In C. C. Adley (Ed.), Food-borne Pathogens: Methods and Protocols p: 15-26.
- Little, C.L., Barnes, J., Mitchell, R.T. (2002) Microbiological quality of take-away cooked rice and chicken sandwiches: effectiveness of food hygiene training of the management. Communicable Disease and Public Health, 4 :289-298.
- Logan, N., & Berkeley, R. (1984). Identification of *Bacillus* Strains Using the API System. Journal of General Microbiology, 130: 1871-1882.
- Loureiro I. (2004) A importância da educação alimentar: o papel das escolas promotoras de saúde. Educação alimentar, 22 (2): 43-55.

- Lund, T., & Granum, P. E. (1996) Characterization of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 141: 151-156.
- Malorny, B., Tassions, P.T., Radstrom, P.; Cook, N., Wagner, M. & Hoorfar, J. (2003) Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. International Journal of Food Microbiology, 83(1): 39-48.
- Mahler D., Chanlet P., Spinaci S., Harries A.S. & Limarier P.I. (1997) Tuberculosis: WHO guidelines for national programme , Geneva.
- Marchi, D.M., Baggio N., Teo, C.R.P.A. & Busato M.A. (2011) Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Município de Chapecó, Estado de Santa Catarina, Brasil, no período de 1995 a 2007. Epidemiologia e Serviços de Saúde, 20(3): 401-7.
- Martinez, M. F., Haines T., Waller M., Tingey D. & Gomez W. (2007) Probable occupational endophthalmitis. International Archives of Occupational and Environmental Health, 62: 157–160.
- Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas: Gabinete de Planeamento e Políticas (2007) - Culturas arvenses: diagnóstico sectorial. p: 58
- Mims, C., Dockrell, H., Goering, R., Roitt, I., Wakelin, D. & Zuckerman, M. (2004) Microbiologia Médica, p: 310, 637.
- Moyer J.H., Mills L.C., Yow E.M. (1953) Toxicity of polymyxin B. I. Animal studies with particular reference to evaluation of renal function. Archives of Internal Medicine, 92: 238-47.
- Mossel, D.A.A.; Koopman, M.J. & Jongerius, E. (1967) Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. Journal of Applied Microbiology, 15: 650-653.
- Monteville, T.J. & Matthews, K.R. (2008) Food Microbiology Introduction. Washington, p: 428
- Martins, A.K.D.S., Martins, F.D.S. (2013) O género *Bacillus* e sua utilização probiótica. Arquivo Brasileiro de Microbiologia Básica e Aplicada, 1: 15-23.
- Molva, C., Sudagidan, M., & Okuklu, B. (2009) Extracellular enzyme production and enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains isolated from cheese in Turkey. Food Control, 20: 829-834.
- Moraes, C. (2000). Complexidade e comunicação mediada por computador. Tese de Doutorado em Educação, Área do Conhecimento de Metodologia do Ensino da Matemática. Braga: Universidade do Minho.
- Nakamura, L. K. (1998). *Bacillus pseudomycoides* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 48: 1031-1035.
- NP EN ISO/IEC 17025- Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.
- Nunes E. & Breda J. (2001) Manual para uma alimentação saudável em jardins de infância. Lisboa: Ministério da Saúde/Direção-Geral da Saúde;

- Ouoba, L. I. I., Thorsen, L. & Varnam, A. H. (2008) Enterotoxins and emetic toxins production by *Bacillus cereus* and other species of *Bacillus* isolated from Soumbala and Bikalga, African alkline fermented food condiments. *International Journal of Food Microbiology*, 124: 224- 230.
- Pan. Y., Subba Rao, J.D.V. & Mann, C.H. (1996) Changes in domoic acid production and cellular chemical composition of the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* under phosphate limitation. *Journal of Phycology*, 32(3): 381.
- Pereira, B.A., Rocha, G., Nunes, L.J., Ferreira, M. & Barroso, R. (2012) Seção de Neonatologia da S.P.P., Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca, Reunião de Atualização – Infeciologia Neonatal, p: 01-24.
- Portaria n.º 905/90, — de 26 de Setembro de 2000, Diário da República — I Série -A Ministros das Finanças e da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.
- Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J. & Sohier, D. (2011) Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*, 28(5): 848-86.
- Rajkowski, K. T. & Bennett, R. W. (2003) *Bacillus cereus*. In: Miliotis M.D., Bier J. W., (Eds.). *International Handbook of Foodborne Pathogens*; New York: Marcel Dekker Inc. p: 27-40.
- Regulamento (CE) N.º 1881/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho de 19 de Dezembro de 2006.
- Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis a géneros alimentícios.
- Rhodehamel, E.F. & Harmon, S.M. (1995) *Bacillus cereus* in: Food and Drug Association (FDA) – Bacteriological Analytical manual. Arlington: Association of official Analytical Chemists, 14(8): 01-08.
- Scallan E, Hoekstra R.M; Angulo F.J; Tauxe R.V.; Widdowson M.A. & Roy S.L. (2011) Foodborne Illness Acquired in the United States –Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 17(1): 7-15.
- Schoeni, J. L. & Wong, A. C. L. (2005) *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *Journal of Food Protection*, 68 (3): 636-648.
- Schraft, H. & Griffiths, M.W. (2006) *Bacillus cereus* gastroenteritis. *Foodborne Infections and Intoxications*, 15: 563-577.
- Senesi, S. & Ghelardi, E. (2010) Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. *Toxins*, 2(7): 1690-1703.
- Carvalho, T., Cardigos, A. & Henriques, M. (2014) Revista da UIIPS, Unidade de Investigação do Instituto Politécnico de Santarém, 2:46.
- Settanni, L. & Corsetti, A. (2007) The use of multiplex PCR to detect and differentiate food and beverage-associated microorganisms: a review. *Journal of Microbiological Methods*, 69(1): 1-22.

- Simone, E., Goosen, M., Notermans, S.H.W. & Borgdorff, M.W. (1997) Investigations of foodborne diseases by food inspection services in the Netherlands, 1991 to 1994. *Journal of Food Protection*, 60(4): 442-446.
- Spira, W.M. & Goepfert, J.M. (1972) *Bacillus cereus*-induced fluid accumulation in rabbit ileal loops. *Journal of Applied Microbiology*, 24: 341–348.
- Strauss, R., Mueller A., Wehlrt M., Neureiter D., Fischer E., Gramatzki M. & Hahn E. G. (2001) Pseudomembranous tracheobronchitis due to *Bacillus cereus*. *Clinical Infectious Diseases*, 33:39–41.
- Svensson, B., Ekelund, K., Ogura, H., Christiansson, A.(2004) Characterisation of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. *International Dairy Journal*, 14: 17-27
- Tortora, G., Funke, B. & Case, C. (2003) *Microbiologia*, 6ª Edição, p: 671
- Ueda, S., Yamazaki, M., Machida, A., Akao, A. & Kuwabara, Y. (1992) Ecological study of *Bacillus cereus* in Rice crop processing. III Airborne *B. cereus* in Rice Mills. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents*, 16: 459–464.
- Valero, M., Fernández, P.S. & Salmerón, M.C. (2003) Influence of pH and temperature on grow of *Bacillus cereus* in vegetable substrates. *International Journal of Food Microbiology*, 82(1): 71-79.
- Veiga, A., Lopes, A., Carrilho, E., Silva, L., Dias, M., Seabra, M.,Borges, M., Fernandes, P. & Nunes, S. (2009) Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, p: 01-330.
- Viegas, S.J. (2009) Contaminação microbiológica dos alimentos, Unidade de Observação e Vigilância, Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, p:12-13.
- Viegas, S. (2009) Alterações do Estado de Saúde Associadas à Alimentação: Contaminação microbiológica dos Alimentos, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, p: 04-46.
- Vissers, M. M. M., Te Giffel, M. C., Driehuis, F., De Jong, P. & Lankveld, J. M. G. (2007) Minimizing the level of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk. *Journal of Dairy Science*, 90(7): 3286-3293.
- Wijnands, L., Dufrenne, J., & Leusden, F. V. (2005). *Bacillus cereus*: characteristics, behaviour in the gastro-intestinal tract, and interaction with Caco-2 cells: National Institute for Public Health and Environment,p: 1-86.
- WHO (2007) Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula Guidelines World Health Organization in collaboration with Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Young, V. R. & Pellet, P. L. (1994) Plant proteins in relation to human protein and amino-acid nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 59(5): 1203-1212.

- Web sites acedidos:
  - <http://ccgb.fiocruz.br/index?services> Acedido dia 15 de Fevereiro às 22:14;
  - <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/eurostat/home/> Acedido dia 04 de Dezembro às 23:14;
  - <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> Acedido dia 06 de fevereiro às 21:17;
  - <http://ndb.nal.usda.gov/> Acedido dia 16 de Dezembro às 22:56;
  - <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/> Acedido dia 12 de Dezembro às 20:00;
  - <http://www.ania.pt/> Acedido dia 11 de Novembro às 20:44;
  - <http://www.asae.pt/> dia 26 de fevereiro de 2014 às 22:01;
  - <http://www.cdc.gov/> acedido dia 22 de fevereiro de 2014 às 14:18;
  - <http://www.ipq.pt/> acedido dia 28 de Janeiro de 2014 às 19:02
  - <http://www.mapsofworld.com/> Acedido dia 16 de janeiro às 22:12;
  - <http://www.min-saude.pt/portal/> Acedido em 08 de Abril às 21:09;
  - <http://www.producersrice.com/rice/facts.html> Acedido dia 19 de janeiro às 23:22;
  - <http://www.realcaos.com/> Acedido em 08 de Dezembro às 19:03;
  - <http://www.sgs.pt/> Acedido em 08 de Dezembro às 23:07;
  - <http://www.solabia.fr/> Acedido em 19 de Dezembro às 22:27;
  - <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/en/> Acedido em 16 de Novembro às 01:11.



## 8. ANEXOS:

**Anexo I:** Testes (50 microtubos,0-49) que compõem a galeria API 50 CH®. A fermentação traduz-se por uma alteração de cor (de vermelho para amarelo ou de vermelho para preto no caso da Esculina) após 48 horas de incubação a 30 °C.

Microtubo	Teste	Componentes ativos
0	CONTROLO	CONTROLO NEGATIVO
1	GLY	GLIcerol
2	ERY	ERItritol
3	DARA	D-ARAbinose
4	LARA	L-ARAbinose
5	RIB	D-RIbose
6	DXYL	D-XIlose
7	LXYL	L-XIlose
8	ADO	D-ADOnitol
9	MDX	Metil-βD-Xilopiranosido
10	GAL	D-GALactose
11	GLU	D-GLUcose
12	FRU	D-FRUctose
13	MNE	D-MaNosE
14	SBE	L-SorBosE
15	RHA	L-RAmnose

**Anexo I:** Testes (50 microtubos,0-49) que compõem a galeria API 50 CH®. A fermentação traduz-se por uma alteração de cor (de vermelho para amarelo ou de vermelho para preto no caso da Esculina) após 48 H de incubação a 30 °C (Continuação).

16	DUL	DULcitol
17	INO	INOsitol
18	MAN	D-MANitol
19	SOR	D-SORbitol
20	MDM	Metil- $\alpha$ D-Manopiranosido
21	MDG	Metil- $\alpha$ D-Glucopiranosido
22	NAG	N-AcetilGlucosamina
23	AMY	AMlgdalina
24	ARB	ARButina
25	ESC	ESCulina Citrato de ferro
26	SAL	SALicina
27	CEL	D-CELobiose
28	MAL	D-MALtose
29	LAC	D-LACtose
30	MEL	D-MELibiose
31	SAC	D-SACarose
32	TRE	D-TREalose
33	INU	INUlina
34	MLZ	D-MeLeZitose
35	RAF	D-RAFinose

**Anexo I:** Testes (50 microtubos,0-49) que compõem a galeria API 50 CH®. A fermentação traduz-se por uma alteração de cor (de vermelho para amarelo ou de vermelho para preto no caso da Esculina) após 48 h de incubação a 30 °C (Continuação).

36	AMD	AmiDo
37	GLYG	GLIcoGénio
38	XLT	XiLiToI
39	GEN	GENtiobiose
40	TUR	D-TURanose
41	LYX	D-LIXose
42	TAG	D-TAGatose
43	DFUC	D-FUCose
44	LFUC	L-FUCose
45	DARL	D-ARabitol
46	LARL	L-ARabitol
47	GNT	GlucoNato de potássio
48	2KG	2-CetoGluconato de potássio
49	5KG	5-CetoGluconato de potássio

Preenchimento vermelho: teste negativo; Preenchimento amarelo e preto: Teste positivo.

**Anexo II:** Testes que compõem a galeria API 20 E® até ao teste GLU-D-glucose após 48 horas de incubação a 30 °C. Os testes positivos foram ADH-L-arginina, GEL-Gelatina (origem bovina) e GLU-D-glucose.

Microtubo	Teste	Componentes ativos
1	ONPG	2-nitrofenil-βD-galactopiranosida
2	ADH	L-arginina
3	LDC	L-lisina
4	ODC	L-ornitina
5	CIT	Citrato de sódio
6	H <sub>2</sub> S	Tiosulfato de sódio
7	URE	Ureia
8	TDA	L-triptofano
9	IND	L-triptofano
10	VP	Piruvato de sódio
11	GEL	Gelatina (origem bovina)
12	GLU	D-glucose

Preenchimento vermelho-alaranjado, preto e amarelo-acinzentado: teste positivo; preenchimento branco, verde pálido e rosa: teste negativo.



**Validação de metodologia para detecção de  
*Bacillus cereus* em arroz e produtos à base de  
cereais**

**Tatiana Frechaut**